ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLAERUNG NEUER STOFFWECHSELPRODUKTE VON GIBBERELLA ZEAE (GORDON) (SCHW.) PETCH. [FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE]

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Georg Bolliger
aus Basel und Schmiedrued (AG)

Basel 1971

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLAERUNG NEUER STOFFWECHSELPRODUKTE VON GIBBERELLA ZEAE (GORDON) (SCHW.) PETCH. [FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE]

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Georg Bolliger
aus Basel und Schmiedrued (AG)

Basel 1971

Teningen/Baden, 1971
Heinrich Blum – Offsetdruck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Genehmigt von der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren

Dr. Ch. Tamm
Dr. C. A. Grob

Basel, den 29. Juni 1971

Prof. H. P. Laubscher
Dekan

i.V. Prof. Dr. S. Fallab
Prodekan

Die vorliegende Arbeit wurde in
den Laboratorien des Instituts für
Organische Chemie der Universität Basel
unter der Leitung von Herrn
Prof. Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Herrn Professor Tamm danke ich
herzlich für sein reges Interesse
an dieser Arbeit, für seine
stete Hilfsbereitschaft und für das
angenehme Arbeitsverhältnis.

Meinen Eltern und

meiner Frau

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTS-VERZEICHNIS

Seite

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung 1

1. Makrolide 1

1.1. Definition und Uebersicht 1

1.2. Zearalenon: Isolierung, Struktur, biologische Wirkung 4

2. Problemstellung 6

II. Lebensansprüche und Sekundärstoffwechsel der Pilzspezies Gibberella zeae 7

1. Allgemeines 7

2. Charakterisierung des Mikroorganismus Gibberella zeae 8

3. Material und Methoden 9

3.1. Herkunft von Gibberella zeae 9

3.2. Herstellung der Nährmedien 9

3.3. Extraktion und Gehaltsbestimmung von Zearalenon 10

4. Wachstumsbedingungen und Zearalenonbildung 13

4.1. Feuchtigkeitsgehalt des Mais-Nährmediums 13

4.2. Einfluss der Inkubationstemperatur 16

4.3. Einfluss von Licht 17

4.4. Einfluss der Inkubationszeit: Bildungskurve 18

4.5. Zearalenonbildung auf verschiedenen Nährmedien 20

4.5.1. Flüssige Medien 20

4.5.2. Feste Medien 24

4.6. Zusammenfassung 26

Seite

III. Isolierung und Struktur der Metabolite von Gibberella zeae (Gordon) NRRL 2830 (Fusarium graminearum Schwabe) 27

1. Allgemeines 27

2. Ergosterol (2): Isolierung/Charakterisierung 27

3. Zearalenon und verwandte Metabolite 30

3.1. Isolierung der Metabolite 30

3.2. Identifizierung von Zearalenon (1) 32

3.3. Struktur der neuen Metabolite 42

3.3.1. 5-Formyl-zearalenon (6) 42

3.3.2. 7'-Dehydro-zearalenon (10) 57

3.3.3. 8'-Hydroxy-zearalenon (11) und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14) 64

B. EXPERIMENTELLER TEIL 76

1. Allgemeines 76

2. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830] und Isolierung von Ergosterol aus dem Mycel 77

2.1. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830] 77

2.2. Isolierung von Ergosterol (2) 78

2.3. 3-O-Acetyl-ergosterol (3) 79

3. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830] auf Mais und Isolierung von Zearalenon und der verwandten Metabolite 80

3.1. Mikrobieller Hauptansatz 80

3.2. Isolierung von Ergosterol 82

3.3. Isolierung von Zearalenon und verwandten Metaboliten 82

3.4. Zearalenon (1) 85

3.4.1. 4-O-Methyl-zearalenon (4) 2,4-Di-O-methyl-zearalenon (5) 85

Seite

3.5. 5-Formyl-zearalenon (6) 87

3.5.1. Synthese von 5-Formyl-zearalenon (6) und 3-Formyl-zearalenon (7) 87

3.5.1.1. 2,4-Di-O-methyl-5-formyl-zearalenon (8) 90

3.5.1.2. 2,4-Di-O-methyl-3-formyl-zearalenon (9) 91

3.6. 7'-Dehydro-zearalenon (10) 92

3.7. 8'-Hydroxy-zearalenon (11) 93

3.7.1. 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxy-zearalenon (12) 93

3.7.2. 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxy-zearalenon (12)
2,4-Di-O-methyl-8'-epi-hydroxy-zearalenon (15) 94

3.7.3. CrO_3-Oxidation von 12:
2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon (13) 94

3.8. 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14) 95

3.8.1. 2,4-Di-O-methyl-8'-epi-hydroxy-zearalenon (15) 96

3.8.2. CrO_3-Oxidation von 15:
2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon (13) 96

C. ZUSAMMENFASSUNG 98

D. LITERATUR-VERZEICHNIS 100

E. CURRICULUM VITAE 104

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung

1. Makrolide

1.1. Definition und Uebersicht

Als "Makrolide" bezeichnet man eine Gruppe von Pilzmetaboliten, deren gemeinsames chemisches Kennzeichen ein mittlerer bis grossgliedriger Lactonring ist.

In einer Reihe von Makroliden sind die Lactonringe glykosidisch mit einem bis mehreren Zuckern verknüpft; andere treten nur als Aglykon auf.

Die meisten Vertreter dieser Substanzklasse wurden aus Streptomyces-Arten isoliert und besitzen oft antibiotische Eigenschaften. Auf Grund ihrer sehr nützlichen biologischen Aktivität, die sich von einer allgemein antibakteriellen über eine antifungische bis zu einer gewissen Wirksamkeit gegen Viren und Rickettsien erstreckt, haben sie medizinisch grosse Bedeutung erlangt. Als Beispiele für therapeutisch verwendete Makrolide seien Carbomycin [1], Erythromycin [2] und Nystatin (Mycostatin) erwähnt.

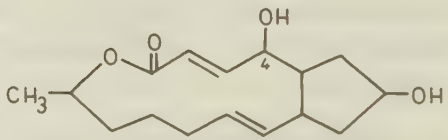
Für den biochemiscn interessiertenChemiker sind Makrolide ausgezeichnete Modelle für das Studium der Zusammenhänge zwischen primärem und sekundärem Stoffwechsel.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Biogenese zunächst dem Syntheseweg eines primären Metaboliten

folgt [3] [4]. Durch ungewöhnliche Verknüpfung von primären Stoffwechselprodukten, wie Acetat, Propionat, Aminosäuren etc., entstehen Intermediärprodukte (z. B. Poly-β-Carbonyl-Verbindungen), die durch spezifische Folgereaktionen zu den chemisch verschiedenartigsten sekundären Stoffwechselprodukten modifiziert werden [4].

Es soll im folgenden versucht werden, unter Berücksichtigung biogenetischer Gemeinsamkeiten und Kombinationsmöglichkeiten einen Ueberblick über die Mannigfaltigkeit der Makrolidstrukturen zu geben.

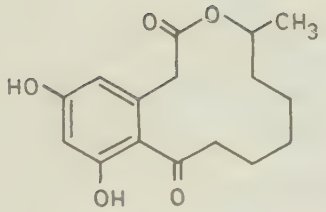
Das einfachste bekannte Makrolid ist Brefeldin A [5] [6], dessen Biogenese 1968 von Handschin und Tamm [7] aufgeklärt wurde.



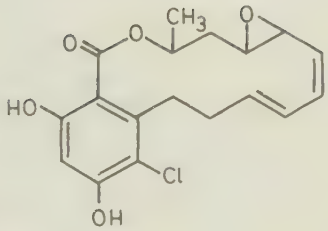
Brefeldin A

Biogenetisch leitet sich Brefeldin A aus 8 Acetat-Einheiten ab, die durch Kopf-Schwanz-Kondensation miteinander verknüpft sind. Erwähnenswert ist die interne Cyclisation des hypothetischen Okta-Ketids unter Bildung des Fünfrings und die Hydroxylgruppe in 4-Stellung, die auf Grund der Radioaktivitätsverteilung nach Inkorporation von [1-^{14}C]-Acetat nicht aus Essigsäure stammen kann.

Als Beispiel für Makrolide mit aromatischem Ring seien Curvularin [8] und Radicicol [9] (Monorden [10]) erwähnt.



Curvularin



Radicicol (Monorden)

Curvularin ist ebenfalls nur aus Acetat-Einheiten aufgebaut.

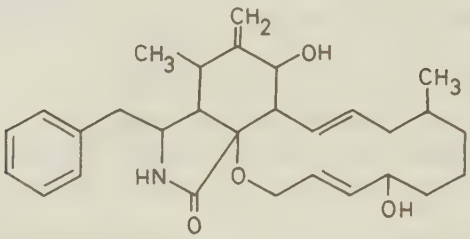
In diesem Zusammenhang sei auf eine mögliche Beziehung zwischen Makroliden und polycyclischen, aromatischen Verbindungen hingewiesen. Ettlinger et al. [11] nehmen an, dass die Biogenese solcher aromatischer Systeme intermediär über Polyketo-Lactone verläuft. Wird die Cyclisation aus sterischen Gründen teilweise oder ganz verhindert, so würden dann eben Makrolide entstehen.

Radicicol, dessen Biogenese noch nicht bekannt ist, sich aber vermutlich auch von Acetat-Einheiten ableitet, ist wegen seiner biologischen Wirkung besonders erwähnenswert. Die Verbindung zeichnet sich neben stark antifungischer Aktivität durch eine bemerkenswerte sedative Wirkungskomponente aus.

Einige Vertreter der Makrolide sind im wesentlichen aus Propionat-Einheiten aufgebaut, wie z.B. Erythromycin [12], oder zeigen einen gemischten Aufbau aus Acetat- und Propionat-Einheiten, wie Magnamycin [13] [14].

In jüngster Zeit ist die Struktur völlig neuartiger Makrolide bekannt geworden. Als Beispiel eines gut untersuchten Vertreters dieses Strukturtyps soll hier Phomin [15] auf-

geführt werden, dessen Biogenese 1970 von Binder, Kiechel und Tamm aufgeklärt worden ist [16].



Phomin

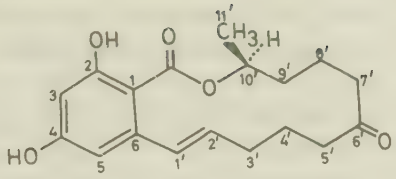
Im Phomin sind verschiedene Biogenese-Prinzipien verwirklicht. Die Molekel wird aus Phenylalanin, Methionin als C_1-Lieferant und 9 Acetateinheiten aufgebaut. Mögliche biogenetische Mechanismen für die Verknüpfung dieser Primär-Metaboliten zur speziellen Struktur des Sekundär-Metaboliten Phomin müssen vorläufig noch Spekulation bleiben.

1.2. Zearalenon: Isolierung, Struktur, biologische Wirkung

1962 berichteten Stob und Mitarbeiter [17] über die Entdeckung und Isolierung verschiedener Stämme der Pilzspezies Gibberella zeae [Fusarium graminearum], die sich durch bemerkenswerte anabole und uterotrophe Aktivität auszeichneten. Es gelang den Autoren, den Träger dieser Wirkung, eine farblose, optisch aktive Substanz vom Smp. 161 - 163°, aus dem Pilzmycel zu isolieren.

1966 konnten Urry et al. [18] durch klassische Abbauversuche sowie durch NMR.- und MS.-Studien die Konstitution des neuen Metaboliten ermitteln. Auf Grund ihrer Herkunft und ihrer Strukturelemente erhielt die neue Verbindung den Namen Zearalenon (1). Die absolute Konfiguration wurde 1967 von Wendler et al. [19] in Zusammenarbeit mit Urry und Mullen-

bach [19] ermittelt.



Zearalenon (1)

Die Strukturformel zeigt einen β-Resorcylsäure-Teil, der mit einem aliphatischen Teil zu einem 14-gliedrigen Lactonring verknüpft ist und erinnert damit stark an das bereits erwähnte Makrolid-Antibioticum Radicicol [9] (Monorden [10]).

Biologisch ist Zearalenon eine ausserordentlich interessante Substanz. Die Verbindung zeichnet sich, im Unterschied zu andern Makroliden, die hauptsächlich durch vielfältige antibiotische Wirkung bekannt sind, wie erwähnt durch bemerkenswerte östrogene (anabole und uterotrophe) Aktivität aus. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass sich besonders die pharmazeutische Industrie für die Verbindung zu interessieren begann. In den Jahren 1967 - 1969 sind eine Reihe Publikationen erschienen, in denen verschiedene Forschergruppen aus Industrielaboratorien über Totalsynthesen von Zearalenon und Derivaten berichteten [2a].

Wie aus Patentschriften zu entnehmen ist, wird eine mögliche Verwendung von Zearalenon als Futtermittelzusatz im Augenblick noch geprüft.

Ferner sind Untersuchungen im Gange [21], die zum Ziele haben, strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen Zearalenon und den östrogenen Steroidhormonen in Bezug auf biologische Wirkung zu finden.

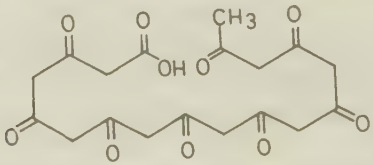
2. Problemstellung

Nachdem die Struktur von Zearalenon bekannt war, stellte sich sogleich die Frage nach seiner Biogenese.

Mit nur 18 Kohlenstoffatomen gehört Zearalenon zu den kleineren Vertretern der Makrolide. Die gerade Kohlenstoffzahl und das relativ einfache Substitutionsmuster lassen vermuten, dass als biogenetische Vorläufer in erster Linie Acetat, bzw. Malonat als Kettenverlängerungs-Reagens, in Frage kommen.

Man geht dabei von der heute allgemein anerkannten Annahme aus, dass durch enzymatische Kopf-Schwanz-Kondensation solcher Einheiten, intermediär eine Poly-β-Carbonyl-Kette entsteht, die dann durch entsprechende Folgereaktionen in die verschiedensten Naturstoffe umgewandelt wird.

Analog zu dieser Reaktionsweise kann für Zearalenon eine aus 9 Acetat-Einheiten aufgebaute Zwischenstufe angenommen und auch vernünftig formuliert werden:



Interne, aldolartige Kondensation dieses Nona-Ketids zum aromatischen Ring, entsprechende Reduktionsschritte und Cyclisation würden dann zum makrocyclischen β-Resorcylsäure-Lacton führen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand anfänglich darin, abzuklären, ob die Acetat-Hypothese für Zearalenon

zutrifft. Dazu mussten erst die für eine biosynthetische Arbeit notwendigen Voraussetzungen geschaffen werden.

Es galt, ein geeignetes Nährmedium zu finden, das sich für Inkorporationsversuche eignete und auf dem der Mikroorganismus Gibberella zeae genügend Material für Abbauversuche lieferte.

Im Rahmen dieser sehr langwierigen und zeitraubenden Arbeit konnten eine Reihe neuer Metabolite (möglicherweise biogenetische Zwischenstufen von Zearalenon) isoliert werden.

Ueber die Isolierung und Strukturaufklärung dieser Stoffe wird im zweiten Teil dieser Dissertation berichtet.

II. Lebensansprüche und Sekundärstoffwechsel der Pilzspezies Gibberella zeae

1. Allgemeines

Die Mehrzahl der für Pilze in Frage kommenden Lebensräume ist durch alle möglichen Pflanzen, Tiere und Kleinstlebewesen besiedelt. Die ökologischen Beziehungen zwischen diesen Lebewesen erstreckt sich von einer extremen Ausschliesslichkeit (Antibiose) über ein scheinbar gleichgültiges Nebeneinander bis zur vollständigen Durchdringung (Symbiose, Parasitismus).

Im Unterschied zur Symbiose, wo eine Lebensgemeinschaft zu beiderseitigem Nutzen gebildet wird, ist parasitäres Verhalten stets dadurch charakterisiert, dass ein Organismus auf Kosten eines bestimmten anderen lebt und einen schädigenden Einfluss ausübt. Die Schädigung des Wirts erfolgt durch Entzug von Nährstoffen, vor allem aber durch Metabolite, die vom Parasiten produziert werden und die in den Stoffwechsel des pflanzlichen Partners eingreifen.

Die Kultivierung parasitärer Mikroorganismen im Laboratorium hat zumeist zum Ziele, bestimmte für die parasitische Lebensweise charakteristische Stoffwechselleistungen zu erhalten. Dies gelingt nicht immer, vielmehr verlieren die Organismen durch die Umstellung auf künstliche Substrate oft ihre natürliche Agressivität. So erfolgt zum Beispiel die Produktion von Mutterkornalkaloiden noch heute durch künstliche Infektion von Roggenähren mit Claviceps purpurea. Submerskulturen bestimmter Stämme wie Claviceps paspali sind erst unlängst bekannt geworden.

2. Charakterisierung des Mikroorganismus Gibberella zeae

Gibberella zeae ist ein typischer Vertreter des Parasitismus. Der Mikroorganismus wächst mit Vorliebe auf allen möglichen Getreidearten und verursacht dort Wurzelhalsfäule und Ährenbrand. Charakteristisch für seine parasitische Lebensweise ist die Bildung von Zearalenon.

Gibberella zeae (Gorden)(Schw.) Petch. gehört zur Klasse der Ascomycetes, Ordnung Hypocreales, und ist die Hauptfruchtform von Fusarium graminearum Schwabe. Die Nebenfruchtform zählt zur Klasse der Deuteromycetes [Fungi imperfecti], Ordnung Moniliales, Familie Tuberculariaceae.

Oftmals ist der gesamte Entwicklungszyklus einer Pilzspecies nur unvollständig bekannt. Dies führt dann dazu, dass ein und derselbe Pilz auf Grund seiner verschiedenen Fruktifikationsformen in verschiedene Klassen eingeteilt wird.

Wir halten uns an die in der Mikrobiologie übliche Terminologie und benutzen im folgenden den Namen, der auf der höchstentwickelten Fruchtform basiert.

Gibberella zeae wächst auf allen von uns geprüften synthetischen und semi-synthetischen Nährmedien sehr schnell

und erreicht im Durchschnitt nach 6 Tagen Wachstum bei 23° einen Koloniedurchmesser von 8 cm. Die wollige, luftige Myceldecke ist im Zentrum dunkelgelb gefärbt und wird gegen den Rand hin zart rosa bis weiss.

Die Unterseite der Myceldecke zeigt (ähnlich wie Submerskulturen) eine rote Pigmentierung. Die Intensität der Farbe ist abhängig von pH- und Lichteinflüssen (vgl. 4.3. und 4.5.).

3. Material und Methoden

3.1. Herkunft von Gibberella zeae

Für unsere mikrobiologischen Untersuchungen standen uns zwei Stämme der Pilzspecies Gibberella zeae zur Verfügung:

Stamm CBS 185.32 erhielten wir vom Centraaalbureau voor Schimmelculturen, Baarn, Holland, und

Stamm NRRL 2830 stellte uns freundlicherweise die Firma Merck & Co., Inc. Rahway, New Jersey, U.S.A., zur Verfügung. Ihr verdanken wir auch eine authentische Probe Zearalenon.

3.2. Herstellung der Nährmedien

Als Beispiel für zahlreiche Kulturversuche soll hier nur die Herstellung des am häufigsten verwendeten Nährmediums beschrieben werden. Das experimentelle Vorgehen blieb bei allen Versuchen im allgemeinen dasselbe. Für eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Medien verweisen wir auf die einschlägige Literatur [22] [23] [24].

Eine Schrägagarkultur vom Stamm NRRL 2830 (bzw. Stamm CBS 185.32) wurde mit 8 ml einer 0,01 proz. sterilen Natrium-

laurylsulfonat-Lösung aufgeschwemmt und mit 50 ml sterilem, entmineralisiertem Wasser verdünnt.

25 g grobkörniger Mais wurde in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben, mit 10 - 12 ml entionisiertem Wasser versetzt und kräftig geschüttelt, um eine möglichst gleichmässige Befeuchtung der Maiskörner zu erreichen.

Das so präparierte Nährmedium wurde im Druckautoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 0,5 ml der obigen Sporensuspension angeimpft. Die Inkubationszeit betrug je nach Experiment 3 bis 15 Wochen bei 4 - 32°.

3.3. Extraktion und Gehaltsbestimmung von Zearalenon (1)

Um die verschiedenen Faktoren, welche die Bildung von Zearalenon beeinflussen, untersuchen zu können, musste eine rasche und möglichst quantitative Analysenmethode entwickelt werden.

Für die Pilzansätze, die zu diesem Zwecke durchgeführt wurden, wählte man folgende Bedingungen:

Nährmedium : grobkörniger Mais (25 g pro 100 ml Erlenmeyer-Kolben) mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 45 %

Inkubationszeit : 3 Wochen

Inkubationstemp. : 23°

Um die biologischen Schwankungen der einzelnen Kulturen zu kompensieren, wurden für jedes Experiment jeweils 5 Erlenmeyer-Kolben geerntet.

Am Ende der Wachstumsperiode wurde das mit Mycel stark durchwachsene Nährmedium mit dem Mixer in den angegebenen Lösungsmitteln (vgl.Tab. I) fein zerkleinert und anschliessend 16 Stunden im Soxhletapparat extrahiert.

Um den Elutionsgrad der verwendeten Lösungsmittel zu

kontrollieren, wurde der Soxhletrückstand jeweils noch mit Äthanol erschöpfend extrahiert.

Zum Vergleich wurde ausserdem noch die gleiche Menge an sterilisiertem, aber nicht inkubiertem Mais den gleichen Extraktionsmethoden unterworfen.

Die so gewonnenen dunkelroten Rohextrakte wurden über Hyflo filtirert, im Vakuum eingedampft und bei 60° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschliessend wurden die trokkenen Extrakte in Äther aufgenommen und mit 2N $KHCO_3$-Lösung und dest. Wasser gewaschen, bis die Wasserlösung farblos war. Nach Eindampfen und Trocknen der nunmehr dunkelgelben Extrakte wurde das Gewicht erneut bestimmt.

Die Bestimmung des Zearalenongehalts erfolgte semiquantitativ auf dünnschichtchromatographischem Weg. Auf Kieselgelplatten erscheint Zearalenon in Jod-Dämpfen als intensiv gefärbter Fleck, der nicht mit anderen Komponenten des Rohextrakts überlappt. Die Sichtbarkeitsgrenze liegt bei 1 µg Zearalenon. Die Zearalenonmenge wurde nun durch Vergleich mit 2 Reihen bekannter Konzentrationen ermittelt. Die aufgetragenen Menge Rohextrakt wurde konstant gehalten und mit einer grob abgestuften und fein abgestuften Testreihe verglichen. Die so erzielten Werte wurden durch weiteren Vergleich mit entsprechenden Verdünnungsreihen des Rohextraktes überprüft. Daraus ergab sich der Zearalenongehalt mit einer Genauigkeit von ± 5 %.

Eine spätere quantitative Aufarbeitung der vereinigten Rohextrakte bestätigte die Genauigkeit der Methode.

In Tabelle I sind die Gewichtswerte der Rohextrakte, der mit $KHCO_3$ gereinigten Extrakte und des Zearalenons wiedergegeben.

Aus den tabellierten Werten geht eindeutig hervor, dass sich Methylenchlorid als Eluens für eine routinemässige Ex-

Tabelle I: Extraktionsversuche [1] mit verschiedenen Lösungsmitteln

Material (je 125 g)	Eluens (500 ml)	Extraktions-zeit in Std.	Extrakt I in g	Extrakt II [2] in g	Zearalenon in mg
ink. Mais [3]	Benzol	16	1,082	0,971	49
S.-Rückstand	Aethanol	22	3,571	0,594	16
n.ink. Mais [3]	Benzol	16	0,391	0,368	--
S.-Rückstand	Aethanol	22	0,984	0,194	--
ink. Mais	Methylenchlorid	16	1,468	1,283	60
S.-Rückstand	Aethanol	16	3,074	0,215	2
n.ink. Mais	Methylenchlorid	18	0,423	0,372	--
S.-Rückstand	Aethanol	16	0,867	0,129	--
ink. Mais	Essigester	16	2,734	1,426	58
S.-Rückstand	Aethanol	12	1,853	0,185	5
n.ink. Mais	Essigester	16	0,852	0,431	--
S.-Rückstand	Aethanol	12	0,511	0,084	--

1) Alle Versuche wurden im Soxhlet-Apparat durchgeführt

2) Nach Reinigung von Extrakt I mit 2$\underline{N}$ $KHCO_3$-Lösung

3) Abkürzungen: ink. = inkubiert; n.ink. = nicht inkubiert; S. = Soxhlet

traktion von Zearalenon am besten eignet. Mit 97 %, gegenüber 92 % für Essigester, bzw. 75 % für Benzol, ist die Extraktion am effektvollsten. Ein jeweiliger Vergleich von Extrakt I mit Extrakt II zeigt ausserdem, dass mit Methylenchlorid relativ wenig wasser- und $KHCO_3$-lösliches Material extrahiert wird.

Für die Aufarbeitung der nun folgenden Kulturansätze und die Bestimmung des Zearalenongehaltes wurde die in diesem Abschnitt dargelegte Analysenmethode verwendet.

4. Wachstumsbedingungen und Zearalenonbildung

4.1. Feuchtigkeitsgehalt des Mais-Nährmediums

Die Lösung dieses Problems gestaltete sich insofern schwierig, als keine eindeutige Aussage über die Homogenität der Feuchtigkeitsverteilung im Nährmedium gemacht werden konnte. Gerade dieser Faktor aber ist von eminenter Wichtigkeit für ein gleichmässiges Wachstum von Gibberella zeae und damit natürlich auch für die Produktion von Zearalenon.

Ueber den Wassergehalt von handelsüblichem grobkörnigem Mais (Reformhaus Merz A.G., Basel) konnten keine genauen Angaben erhalten werden. Aus der Gewichtsabnahme einer Probe, die während einer Stunde bie 130° getrocknet wurde, ergab sich ein Wassergehalt von ungefähr 10 %. Etwa in der gleichen Grössenordnung lag der Wasserverlust, bedingt durch Sterilisation der feuchten Nährmedien.

Unter Ausklammerung all dieser Unsicherheitsfaktoren errechnet sich also der prozentuale Feuchtigkeitsgehalt nur aus der vor dem Sterilisieren zugegebenen, definierten Menge Wasser.

Um die biologische Streuung der einzelnen Kulturen möglichst zu kompensieren, untersuchten wir pro Messpunkt je 5 100-ml-Erlenmeyer à 25 g Mais. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 23° während 3 Wochen.

Parallel zu diesem Experiment überprüften wir die beiden Gibberella zeae-Stämme auf eventuell vorhandene Unterschiede in ihren biosynthetischen Fähigkeiten. Zu diesem Zweck wurde die Wassergehaltsbestimmung doppelt durchgeführt, einmal mit Stamm NRRL 2830 und einmal mit Stamm CBS 185.32. Die gefundenen Messwerte sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II: Zearalenonbildung in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt des Mais-Nährmediums

Feuchtigkeitsgehalt in %	Zearalenon in mg/kg Mais	
	aus Stamm NRRL 2830	aus Stamm CBS 185.32
20	0	0
25	32	24
30	88	72
35	240	264
40	336	360
45	512	488
50	256	272
55	192	160
60	168	168
70	104	120

Bei einem Feuchtigkeitsgehalt des Mais-Nährmediums von 20 % oder weniger wächst Gibberella zeae überhaupt nicht. Der Mikroorganismus beginnt sich erst bei 25 % langsam zu entwikkeln und zeigt bei einem Wassergehalt von 35 % und mehr eine rapide Vermehrung des Mycels.

Die Zearalenonbildung verläuft anfänglich parallel zum Pilzwachstum und erreicht bei 45 % Wassergehalt ein Maximum.

Ein höherer Feuchtigkeitsgrad beeinträchtigt zwar die Entwicklung des Pilzes nicht, hingegen sinkt die Zearalenonproduktion mit zunehmendem Wassergehalt rapide ab.

Sowohl Stamm NRRL 2830 als auch Stamm CBS 185.32 verhalten sich gleich. In beiden Fällen ist das Wachstum mehr oder weniger unabhängig vom Feuchtigkeitsgehalt, während ihre maximalen biosynthetischen Fähigkeiten für Zearalenon bei einem Wassergehalt von 45 % liegt. Die Abweichungen in der produzierenden Zearalenonmenge liegen innerhalb der Fehlergrenze. Fig. 1 verdeutlicht die von uns gemachten Beobachtungen.

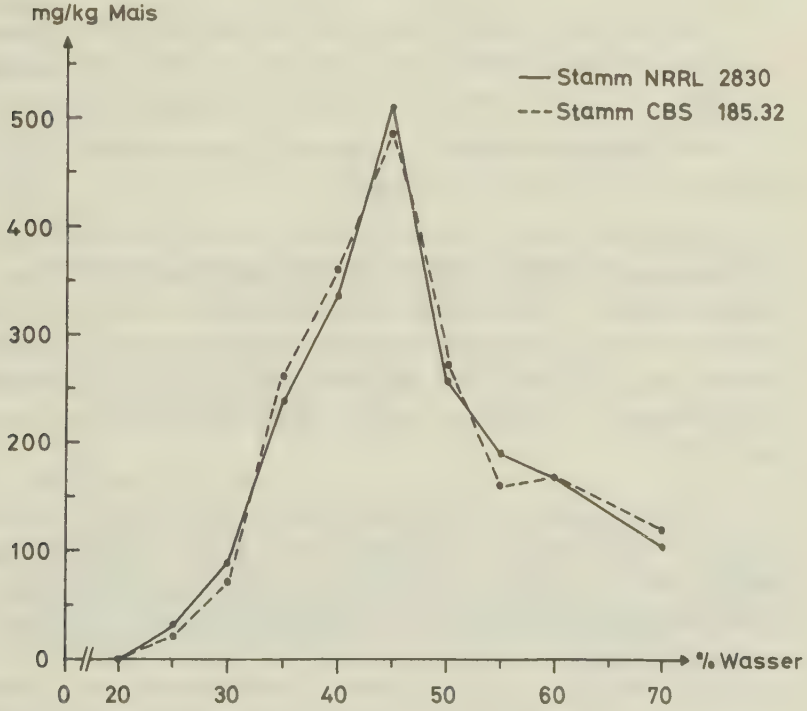


Fig. 1: Bildungskurve von Zearalenon in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt des Mais-Nährmediums

4.2. Einfluss der Inkubationstemperatur

Um unsere Untersuchungen zu diesem Problem auch auf möglichst tiefe Temperaturen ausdehnen zu können, musste unsere Standard-Züchtungsmethode etwas modifiziert werden.

Sterilisierter und angeimpfter Mais mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 45 % wurde zuerst 3 Tage bei 23° inkubiert. Es konnte dadurch ein gleichmässiges, schnelles Anwachsen aller Kulturen erreicht werden. Die innerhalb dieses Zeitraums gebildete Menge Zearalenon (~ 4 mg/kg Mais) kann vernachlässigt werden.

Für das eigentliche Experiment wurden nun je 10 dieser Kulturen während 3 Wochen bei 4, 12, 23, 27 bzw. 32° weiter inkubiert. In Fig. 2 sind die Resultate graphisch dargestellt.

Der Temperaturbereich, in dem die Zearalenonbildung stark begünstigt wird, ist relativ weit.

Beginnend bei 4° (72 mg/kg Mais), steigt die Bildung von Zearalenon mit zunehmender Inkubationstemperatur steil an, erreicht bei 12° ein Maximum (844 mg/kg Mais) und bleibt dann über einen Temperaturbereich von 6° nahezu konstant (812 mg/kg Mais bei 18°). Erst bei weiterer Erhöhung der Inkubationstemp. nehmen die Ausbeuten wieder rapid ab (248 mg/kg Mais bei 32°).

Aus experimentellen Gründen konnten keine Werte im Bereich von 12 - 18° erhalten werden. Der etwas eigentümliche Verlauf der Kurve macht es aber sehr wahrscheinlich, dass das wahre Temperaturoptimum für die Zearalenonbildung irgendwo dazwischen liegt.

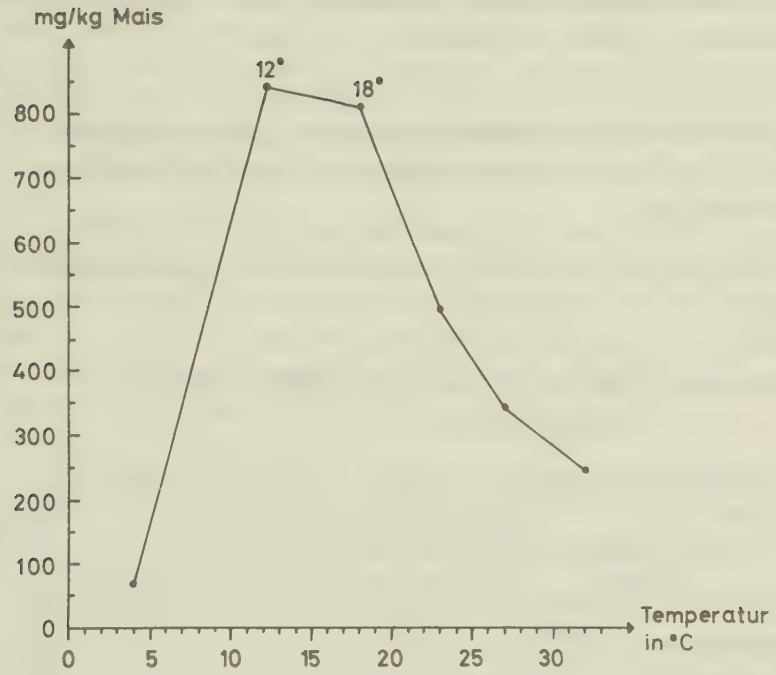


Fig. 2: Zearalenonbildung in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur

4.3. Einfluss von Licht

Es wurde beobachtet, dass Mikroorganismen unter dem Einfluss von Licht oft zu viel stärkerer Pigmentbildung neigen [25] [26]. Ausserdem ist bekannt, dass Pigmente ihrerseits den Stoffwechsel, insbesondere die Atmungskette, eines Organismus stark beeinflussen können. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Funktion der Ubichinone hingewiesen.

Diese Tatsachen veranlassten uns, die Zearalenonbildung unter Einwirkung von Licht und im Dunkeln zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurden je 3mal 5 100 ml-Erlenmeyer-Kolben à 25 g Mais unter optimalen Bedingungen (45 % Feuchtigkeit, 12°) während 3 Wochen inkubiert.

Die Kulturen, welche unter Lichtausschluss wachsen sollten, wurden in Aluminiumfolie eingepackt, während die andere Testreihe dem Tageslicht, bzw. dem Licht einer 60W-Glühbirne ausgesetzt war.

Tabelle III gibt einen Ueberblick über die gefundenen Daten.

Tabelle III: Einfluss von Licht und Dunkel auf die Zearalenonbildung

	Zearalenon in mg/kg Mais			
	Probe I	Probe II	Probe III	Mittelwert
Inkubation im Dunkeln	800	856	816	824
Inkubation unter Licht	832	824	840	832

Die Biogenese von Zearalenon scheint unabhängig von der Lichteinwirkung zu sein. Wenigstens sind die gefundenen Differenzen nicht signifikant. Hingegen konnte rein optisch festgestellt werden, dass die Pigmentbildung unter der Einwirkung von Licht stark bevorzugt wird.

4.4. Einfluss der Inkubationszeit: Bildungskurve

Um die Bildung von Zearalenon in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu verfolgen, war ein länger dauernder Kultuversuch nötig. Unsere Untersuchungen erstreckten sich über 15 Wochen,

wobei in Intervallen von jeweils einer Woche der Zearalenongehalt bestimmt wurde. Pro Messpunkt wurden 5 Erlenmeyer à 25 g Mais (Feuchtigkeitsgehalt 45 %) geerntet. Die Inkubation erfolgte in zwei Testreihen, einmal bei 12° und einmal bei 27°.

Damit konnte gleichzeitig Aufschluss über folgendes schon früher beobachtetes Phänomen erhalten werden.

Auf Dünnschichtchromatogrammen, die zum Zwecke der semiquantitativen Zearalenonbestimmung hergestellt wurden, war neben Zearalenon immer wieder ein unpolarer Fleck zu beobachten, der sich bei längerem Stehenlassen im Jod grün anfärbte. Wie später gezeigt werden konnte, handelt es sich dabei um Ergosterol (2) (vgl. A III. 2).

Rein qualitativ liess sich abschätzen, dass Gibberella zeae für die Synthese der beiden Metabolite verschiedene Temperaturoptima besitzt. Die beiden Synthesenketten zeigen mehr oder weniger gegenläufige Tendenzen.

Mit dem vorliegenden Versuch wurden diese Verhältnisse für zwei verschiedene Inkubationstemperaturen quantitativ erfasst. Die gefundenen Messwerte sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Die Bildung von Zearalenon bzw. Ergosterol setzt während der ersten Wachstumswoche des Mikroorganismus ein, steigt dann bis zur 8. Woche steil an und erreicht nach einem etwas flacheren Anstieg nach der 9. - 10. Woche einen Maximalwert. Bei weiterer Zunahme der Wachstumsperiode werden die beiden Produkte wieder metabolisiert.

Unsere Vermutung, die Enzymaktivität für die beiden Synthesewege sei stark abhängig von der Inkubationstemperatur und in einem gewissen Sinne gegenläufig, konnte bestätigt werden. Beim Temperaturoptimum (12°) für Zearalenon wird nur sehr wenig Ergosterol gebildet. Umgekehrt liegen die Verhältnisse

Tabelle IV: Zeitliche Abhängigkeit der Zearalenon- und Ergosterolsynthese bei 12 und 27°.

Pilzwachstum in Wochen	Zearalenon in mg/kg Mais		Ergosterol in mg/kg Mais	
	Inkubationstemperatur		Inkubationstemperatur	
	12°	27°	12°	27°
1	32	32	24	72
2	168	104	32	224
3	816	312	96	552
4	976	344	120	616
5	1048	360	128	696
6	1096	416	152	712
7	1220	464	184	848
8	1376	472	200	944
9	1448	520	240	976
10	1752	488	248	952
11	1680	352	232	944
12	1496	304	168	888
13	1184	152	112	800
14	1072	120	56	792
15	1024	56	32	648

bei 27°; hier wird die Ergosterolsynthese stark begünstigt. Fig. 3 veranschaulicht unsere Beobachtung.

4.5. Zearalenonbildung auf verschiedenen Nährmedien

4.5.1. Flüssige Medien

Obwohl sich Mais für die Zearalenonbildung als ausgezeichnetes Substrat erwies, war es doch wünschenswert für eventuelle spätere Biosyntheseversuche ein definierteres und vor allem ein flüssiges Nährmedium zur Verfügung zu haben.

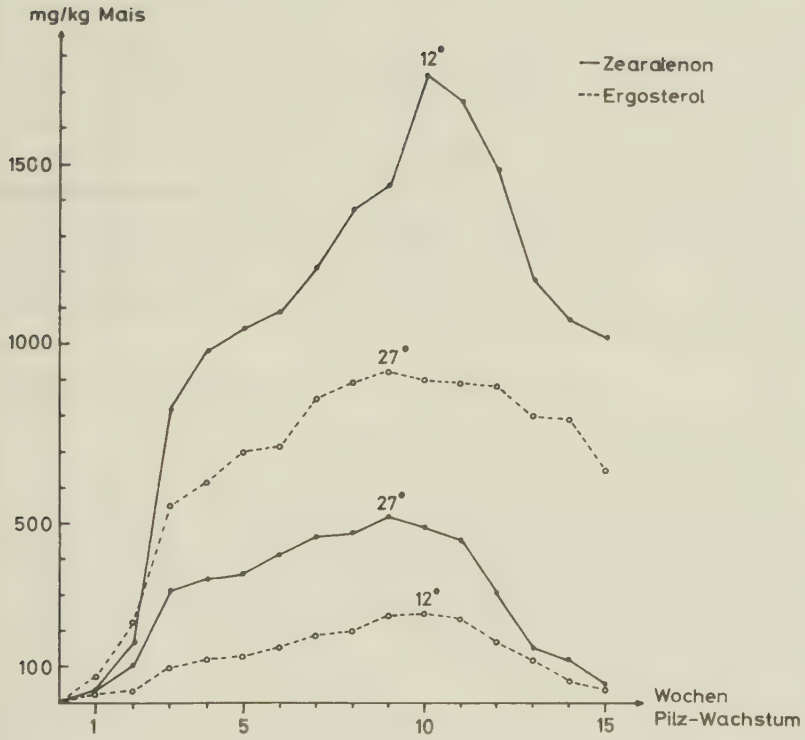


Fig. 3: Bildungskurven von Zearalenon und Ergosterol bei 12° und 27°

Um diese Frage abzuklären, wurde Gibberella zeae zuerst auf folgendem Medium gezüchtet und auf möglichen Zearalenongehalt hin geprüft:

50 g Maislaugepulver
3 g $NaNO_3$
1 g K_2HPO_4
500 mg $MgSO_4.7H_2O$
500 mg KCl
10 mg $FeSO_4.7H_2O$
10 mg $ZnSO_4$
ad 1000 ml H_2O dest.

Für weitere Kulturversuche wurden Varianten dieses Mediums hergestellt, wobei in erster Linie Maislaugepulver durch andere organische Kohlenstoffquellen ersetzt oder ergänzt wurde. Ferner hoffte man, den Mikroorganismus durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie Pepton oder Hefeextrakt günstig beeinflussen zu können. Biotin als Cofaktor für ATP-abhängige Carboxylierungsprozesse, oder organische Säuren, die als Zwischenprodukte im Zitronensäurecyclus auftreten, sollten die Syntheseleistung des Pilzes ebenfalls in gewünschte Bahnen lenken. Weitere Modifikationen ergaben sich durch Aenderung der Salzzusammensetzung und der Protonenkonzentration.

Das experimentelle Vorgehen blieb im Wesentlichen das gleiche wir für die festen Nährböden:

Die Nährlösung wurde in Portionen zu je 100 ml auf 50 500 ml-Erlenmeyer-Kolben verteilt, sterilisiert und mit Gibberella zeae-Sporen angeimpft. Die Inkubation erfolgte zuerst bei 23° bis sich reichlich Mycel gebildet hatte (4 - 5 Tage) und dann während 50 Tagen bei 12°. In Intervallen von zuerst 5, später 10 Tagen wurden je 5 Kulturen geerntet und das Mycel nach der in A II. 3.3. beschriebenen Methylenchlorid-Methode extrahiert. Die Zearalenonbestimmung erfolgte qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie.

In Tabelle V sind die Resultate für die verschiedenen flüssigen Medien zusammengestellt.

Gibberella zeae wuchs auf allen getesteten Medien ausgezeichnet. Das Myceltrockengewicht, ein häufig verwendetes Mass für die Bestimmung dieses Parameters, lag in der Grösenordnung von 1 g/100 ml Nährlösung.

Die Pilzspecies erwies sich in erster Linie als Ergosterolproduzent, wobei Maislaugepulver und Ammoniumionen diese Syntheseleistung noch besonders förderten.

Zearalenon dagegen konnte nur auf sehr wenigen Medien und

SUBSTRAT	Anzahl Tage Pilzwachstum bei 12°									
	0	5	10	15	20	25	30	40	50	
Maislaugepulver + Salze[1)]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Kartoffel-Dextrose-Nährlösung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Raulin-Thom-Medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Saccharose + Salze	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Glucose + Salze	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Maislaugepulver + Salze + 0,1 % Hefeextrakt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Raulin-Thom-Medium + 0,1 % Hefeextrakt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Saccharose + Salze + 0,1 % Hefeextrakt	-	-	-	-	-	+	+	+	+	*
Glucose + Salze + 0,1 % Hefeextrakt	-	-	-	-	-	-	+	+	+	*
Saccharose + Salze + 0,1 % Pepton	-	-	-	-	-	-	-	+	+	*
Glucose + Salze + 0,1 % Pepton	-	-	-	-	-	-	-	-	+	*
Saccharose + Salze + Biotin (5 µg/Liter)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Glucose + Salze + Biotin (5 µg/Liter)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
Saccharose + Salze (NH_4-Succinat statt $NaNO_3$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Saccharose + Salze (NH_4NO_3 statt $NaNO_3$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**
Saccharose + Salze + 0,3 % Bernsteinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*

1) bedeutet: gleiche Salzkomponente + Konzentration wie auf Seite 21 beschrieben

- kein Zearalenon vorhanden

\+ Zearalenon in Spuren vorhanden

* Ergosterol vorhanden

** viel Ergosterol vorhanden

auch da nur in Spuren nachgewiesen werden. Massgebend für die Biogenese dieses Stoffwechselproduktes scheint ein Zusammenwirken definierter Kohlenstoffquellen mit Wachstumsfaktoren zu sein.

Die meisten Versuche erfolgten bei einem pH-Wert des Nährmediums zwischen 5 und 7. Erniedrigung des pH's durch Zugabe von anorganischen oder organischen Säuren beeinflusste das Pilzwachstum nicht, förderte aber die Pigmentbildung in starkem Masse. Ein Gleiches trifft für Experimente zu, bei denen die Belüftungsverhältnisse geändert wurden (z. B. Schüttelkulturen).

4.5.2. Feste Medien

Feste Nährböden haben den grossen Vorteil, dass erheblich höhere Zelldichten erreicht werden und folglich eine wesentlich grössere Ausbeute an sekundären Stoffwechselprodukten zu erwarten ist. Diese Tatsache veranlasste uns, einige Versuche mit solchen Nährmedien durchzuführen.

Zur Herstellung fester Medien werden den Nährlösungen Verfestigungsmittel zugesetzt. Häufige Verwendung findet Agar, ein stark vernetztes, komplex zusammengesetztes Polysaccharid aus Meeresalgen.

In unserem Fall allerdings, wo zusätzlich organische Komponenten nicht erwünscht waren, wurde Silicagel verwendet. Einige Versuche erfolgten auf einem festen Träger, der unter dem Handelsnamen Perlit bekannt ist (Firma F. Haubensak Söhne A.G.). Es handelt sich um ein fein gekörntes Mineral, das als Bodenbelüfter und Regulator für den Wasserhaushalt bei höheren Pflanzen empfohlen wird.

Die Kulturversuche erfolgten auf dem in A II. 4.5.1. beschriebenen Nährmedium, wobei Maislaugepulver durch steigende Mengen (50 - 250 g) Saccharose ersetzt wurde. Als zusätzliche

Komponente wurde Hefeextrakt (1 g/Liter) zugegeben.

Die Nährlösungen wurden in Portionen zu je 100 ml auf 500 ml-Erlenmeyerkolben verteilt, die jeweils 50 g Silicagel bzw. 80 g Perlit enthielten. Nach dem Sterilisieren und Impfen wurden die Kulturen zuerst eine Woche bei 23°, dann 5 Wochen bei 12° inkubiert.

Die Extraktion und Gehaltsbestimmung erfolgte wie üblich (vgl. A II. 3.3.). Die Resultate sind in Tabelle VI zusammengefasst.

Tabelle VI: Zearalenon- und Ergosterolgehalt auf festen Medien

Trägermaterial	Saccharose in g/Liter	Zearalenon in g/Liter	Ergosterol in g/Liter
Silicagel	50	16	28
Perlit	50	36	30
Silicagel	100	30	52
Perlit	100	88	56
Silicagel	150	64	96
Perlit	150	154	104
Silicagel	200	98	138
Perlit	200	262	140
Silicagel	250	142	166
Perlit	250	396	178

Die Ausbeuten an Zearalenon konnten gegenüber flüssigen Medien um ein Vielfaches verbessert werden. Besonders gut gedieh der Organismus Gibberella zeae auf dem körnigen, federleichten Perlit. Die Erhöhung der Substratkonzentra-

tion trug das ihre dazu bei.

Silicagel als Trägermaterial schien etwas weniger geeignet, obwohl auch hier die Ausbeuten durchaus befriedigend waren. Rein optisch konnte festgestellt werden, dass sich der Mikroorganismus etwas weniger gut entwickelte und zu sehr starker Pigmentbildung neigte. Gründe dafür dürften in der pH-Erniedrigung durch das Verfestigungsmittel zu suchen sein.

4.6. Zusammenfassung

Der Mikroorganismus Gibberella zeae scheint für sein Wachstum keine besonderen Nährstoffansprüche zu kennen.

Als äusseres Zeichen einer normalen Entwicklung und Stoffwechselleistung konnte die Bildung der isoprenoiden Verbindung Ergosterol nachgewiesen werden.

Die Bildung von Zearalenon, biogenetisch gesehen vermutlich ein Nonaketid, erfolgte dagegen nur bei definierten Kulturbedingungen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines festen Nährmediums.

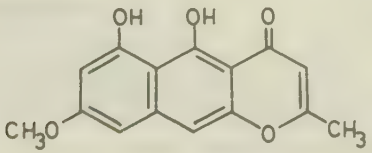
Optimale Verhältnisse liegen vor, wenn Gibberella zeae auf grobkörnigem Mais mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 45 % während ca. 10 Wochen bei 12° inkubiert wird. Befriedigende Ergebnisse können auch auf einem semisynthetischen Nährmedium, das an einem festen Träger absorbiert ist, erzielt werden.

Licht und pH-Aenderungen beeinflussen die beiden Syntheseketten nicht, induzieren aber die Pigmentbildung.

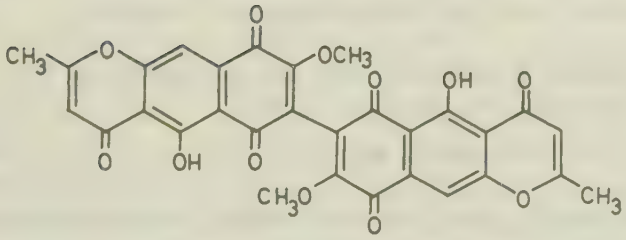
III. Isolierung und Struktur der Metabolite von Gibberella zeae (Gordon) NRRL 2830 (Fusarium graminearum Schwabe)

1. Allgemeines

Der Mikroorganismus Gibberella zeae ist chemisch bisher noch wenig untersucht worden. Ausser dem bereits erwähnten Zearalenon [17], [27] sind lediglich noch zwei Pigmente, Rubrofusarin [28] [29] [30] und Aurofusarin [28] [31] bekannt. Ferner finden sich Hinweise in der Literatur [24], dass dieser Pilz auch Ergosterol zu synthetisieren vermag.



Rubrofusarin



Aurofusarin

2. Ergosterol (2): Isolierung und Charakterisierung

Bei den Arbeiten zur Biogenese von Zearalenon liess sich im Dünnschichtchromatogramm der Rohextrakte immer wieder ein Fleck beobachten, der sich nach längerem Stehenlassen

Abspaltung der angulären 19-Methylgruppe und Stabilisierung des Reaktionsprodukts durch Aromatisierung von Ring B dürfte wohl die treibende Kraft für die Fragmentierung sein.

Die Abspaltung der Seitenkette an C-17 entweder allein oder zusammen mit H_2O wird bei Steroiden oft beobachtet [36]. Wir finden die entsprechenden Bruchstücke bei m/e 271 (rel. Intens. 8,7 %) und m/e 253 (rel. Intens. 16,3 %).

Durch Fragmentierung von Ring C und gleichzeitiger Abspaltung der C-3 Hydroxyl-Gruppe entsteht ein Ion mit m/e 143 und der relativen Intensität 39,5 %. Das relativ starke Fragment-Ion ist ein Hinweis für die Struktur des A/B-Ring-Skeletts [37].

Im weitern war das mit Acetanhydrid in Pyridin bereitete Acetylderivat des isolierten Sterols in jeder Hinsicht identisch mit 3-O-Acetyl-ergosterol (3), das aus Methanol in farblosen Plättchen vom Smp. 179 - 181° und $[\alpha]_D^{24}$ = - 89° ± 1° (Chloroform) erhalten wurde.

Das Massenspektrum von 3-O-Acetyl-ergosterol zeigte im wesentlichen die gleichen Bruchstücke wie Ergosterol. Lediglich an Stelle der Wasserabspaltung tritt Abspaltung von Keten (m/e 42) bzw. Essigsäure (m/e 60) ein. Entsprechend ändert sich auch die Intensitätsverteilung. Wie bei allen Steroiden mit einer 3β-Acetoxy-Δ^5-ungesättigten Gruppierung ist auch hier die Tendenz zur Eliminierung des Säurerestes so gross, dass das Molekel-Ion (m/e 438) nicht beobachtet wird.

3. Zearalenon und verwandte Metabolite

3.1. Isolierung der Metabolite

Um möglichst grosse Ausbeuten an Zearalenon und vor allem an Nebenmetaboliten zu erzielen, war es nötig, einen

Grossansatz auf Mais durchzuführen. 7,5 kg dieses natürlichen Substrats wurden in Portionen zu 300 g auf 25 1-Liter-Erlenmeyer-Kolben verteilt, befeuchtet und sterilisiert.

Die Beimpfung erfolgte nicht wie üblich durch eine Sporensuspension, sondern durch Gibberella zeae-Kulturen, die während 3 Wochen ebenfalls auf Mais kultiviert worden waren. Solche Vermehrungskulturen hatten zum Zwecke, den Mikroorganismus schon vor dem eigentlichen Versuchsbeginn auf seine ursprüngliche parasitische Lebensweise umzustellen und eventuell verlorengegangene spezifische Synthesefähigkeiten zu regenerieren. Die so inokulierten Nährmedien wurden zuerst 1 Woche bei 23°, dann 8 - 10 Wochen bei 12° inkubiert.

Am Ende der Wachstumsperiode wurde das mit Mycel stark durchwachsene Maisnährmedium in Methylenchlorid mit dem Mixer fein zerkleinert und anschliessend im Soxhlet-Apparat extrahiert. Die vereinigten eingedampften Extrakte wurden in Aether wieder aufgenommen und mit 2$\underline{N}$ Na_2CO_3-Lösung ausgezogen. In der Aetherphase fand sich Ergosterol. Der Na_2CO_3-Auszug enthielt neben sehr viel Zearalenon eine ganze Reihe weiterer, bisher unbekannter Metabolite. Durch Säulenchromatographie (Sorptionsmittel: Kieselgel, Lösungsmittel Benzol mit 0-100 % Aether) liess sich eine Vortrennung in vier Gruppen erreichen.

Die weitere Auftrennung der Gruppen in ihre einzelnen Komponenten war wegen der sehr kleinen Polaritätsunterschiede und den geringen Mengen sehr schwierig. Durch weitere Säulenchromatographie, wiederholte Schichtchromatographie und fraktionierte Kristallisation gelang es, neben Zearalenon vier weitere Metabolite in reiner Form zu isolieren. Es handelt sich, wie weiter unten gezeigt wird, um 5-Formyl-zearalenon, 7'-Dehydro-zearalenon, 8'-Hydroxy-zearalenon und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon. Die erhaltenen Mengen und die Rf-Werte im Dünnschichtchromatogramm sind in Tabelle VII angegeben.

Tabelle VII: Zearalenon und verwandte Metabolite

Metabolite	Menge aus 7,5 kg Mais isoliert		*) Rf-Werte (Mittelwerte)
	in g	in ppm	
5-Formyl-zearalenon (6)	0,068	9	0,81
Zearalenon (1)	11,65	1553	0,70
7'-Dehydro-zearalenon (10)	0,046	6	0,66
8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14)	0,141	19	0,39
8'-Hydroxy-zearalenon (11)	0,151	20	0,35

*) Dünnschichtchromatogramm: Kieselgel, Fliessmittel:
1) Chloroform-Aethanol-(96:4
2) Benzol-Methanol-(95:5)

3.2. Identifizierung von Zearalenon (1)

Zearalenon, der Hauptmetabolit, kristallisiert aus Aether-Pentan-(5:1) in farblosen Prismen vom Smp. 163 - 164°; $[\alpha]_{546}^{24}$ = - 173,8° ± 1° (Methanol), $[\alpha]_{D}^{24}$ = - 134,2° ± 1° (Methanol), $[\alpha]_{D}^{24}$ = - 191,8° ± 1° (Chloroform).

Das UV.-Spektrum von 1 in Aethanol (vgl. Fig. 5) zeigt ein Hauptmaximum bei 236 nm (log ε = 4,50). Zwei weitere Banden liegen bei 275 nm (4,16) und 314 nm (3,84). Nach Zugabe von $AlCl_3$ verschieben sie sich um 13 nm nach 288 nm,

resp. um 22 nm nach 336 nm. Diese bathochrome Verschiebung ist charakteristisch für die zur Ester-Carbonylgruppe peri-ständigen Hydroxylgruppe. Zugabe von NaOH führt zu einer weitgehenden Ionisation der Molekel. Die Bande bei 236 nm lässt sich nur noch als schwache Schulter nachweisen, während die Bande bei 275 nm verschwunden ist. Entsprechend wird die Absorption bei 314 nm breiter und intensiver und es tritt eine neue Bande bei 255 nm auf.

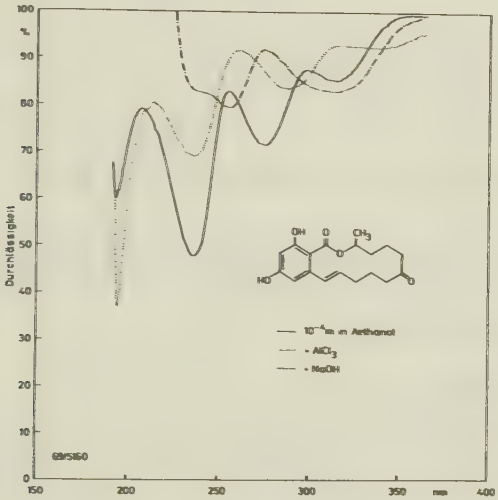


Fig. 5: UV.-Absorptionsspektrum von Zearalenon (1)

Im IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 6) tritt eine breite und intensive Bande bei 3315 cm^{-1} auf (OH). Die Absorption bei 1688 cm^{-1} ist der Carbonyl-Schwingung der Ketogruppe zuzuordnen, während die Absorption der Ester-Carbonylgruppe bei 1642 cm^{-1} zu finden ist. Die bemerkenswert tiefe Lage dieser Schwingung lässt sich durch die Konjugation der Ester-funktion mit dem aromatischen Ring und durch eine Wasser-

stoffbrücke zur periständigen Hydroxylgruppe erklären. Bei 1612 und 1578 cm^{-1} finden sich Aromatenbanden.

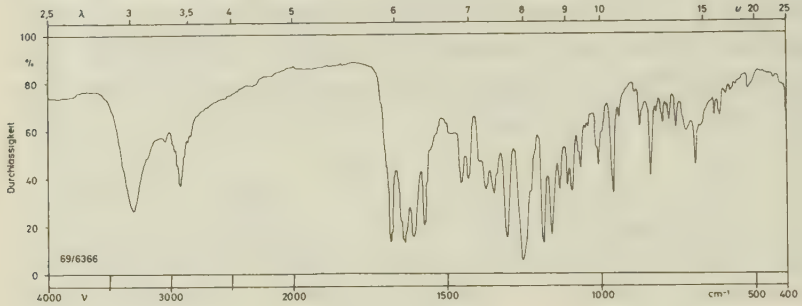


Fig. 6: IR.-Spektrum von Zearalenon (1) in KBr

Im Hinblick auf die Strukturaufklärung der neuen Metabolite werden das NMR.-Spektrum und das Massenspektrum im folgenden genau analysiert.

Im NMR.-Spektrum von 1 (in $CDCl_3$) (vgl. Fig. 7 und Tab.X) lässt sich bei 12,12 ppm ein scharfes Singulett erkennen, das der mit der Ester-Carbonylgruppe verbrückten 2-Hydroxygruppe zugeordnet wird. Die Hydroxylgruppe in 4-Stellung findet man als leicht verbreitertes Singulett bei 7,26 ppm. Ein AB-System mit Zentren bei 6,47 und 6,39 ppm ($J \sim 2{,}5$ Hz, 2H) entspricht den beiden meta-ständigen Protonen am aromatischen Kern. Bei 7,02 ppm findet man das Signal des Vinylprotons an C-1' als Dublett mit J = 16 Hz. Die gleiche, für eine trans-Doppelbindung charakteristische Kopplungskonstante lässt sich aus der komplexen Signalgruppe bei 5,69 ppm (C-2', 1H) herauslesen. Die Aufspaltung des Vinylprotons an C-2' in 8 Linien, wobei die beiden mittleren praktisch zusammenfallen, ergibt sich aus den zusätzlichen Kopplungen mit den offenbar nicht äquivalenten Methylenprotonen an C-3'. Entsprechend finden wir ausser

J = 16 Hz noch Kopplungskonstanten von J = 4,5 Hz und J = 9 Hz. Das bei 5,01 ppm sichtbare Sextett mit der Kopplungskonstante J = 6 Hz entspricht dem Methinproton an C-10'. Aus der Intensitätsverteilung von 1:5:10:10:5:1 lässt sich eine zufällige magnetische Aequivalenz der C-11'-Methylprotonen mit den Methylenprotonen an C-9' ableiten. Das Signal der C-11'-Methylgruppe ist bei 1,40 ppm als Dublett mit J = 6 Hz zu finden. Eine eindeutige Zuordnung der Methylenprotonen ist wegen ihrer sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen nicht möglich. Im wesentlichen lassen sich zwei Gruppen von Methylenprotonen erkennen. Die vier der Keto-Carbonylgruppe benachbarten Protonen (C-5', C-7') absorbieren zusammen mit den beiden allylischen Protonen von C-3' im Bereich von 3,1 - 2,1 ppm, während die übrigen(C-4', C-8', C-9') Signale zwischen 2,1 und 1,5 ppm zeigen.

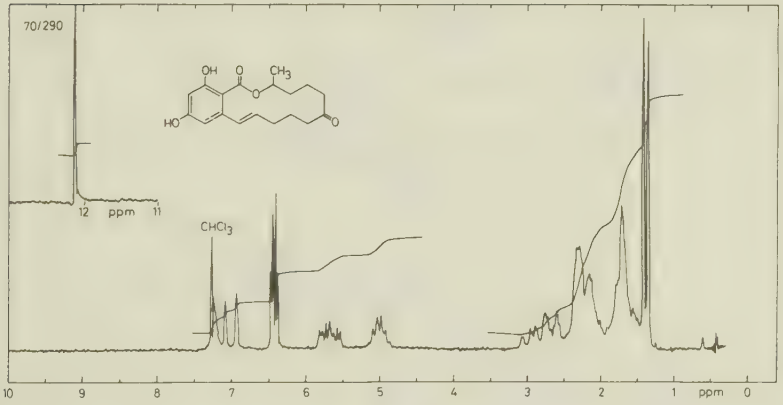


Fig. 7: 100 MHz - NMR.-Spektrum von Zearalenon (1) in $CDCl_3$.

Das Massenspektrum von 1 (vgl. Fig. 8 und Tab. VIII) zeigt eine Reihe charakteristischer Signale. Durch die Bestimmung der genauen Massen zahlreicher Bruchstücke gelang es, einen Einblick in die vielen möglichen Zerfallsreaktionen dieses polyfunktionellen Moleküls zu erhalten. Eine mögliche Sequenz der Fragmentierungsreaktionen ist in Formelschema 1 dargestellt.

Das Molekel-Ion (m/e 318; rel. Intens. 42,7 %) geht durch eine C-C-Spaltung unter Abstraktion eines β-ständigen H-Atoms in das offenkettige Ion A über, welches immer noch die Masse 318 besitzt. Dieses spaltet über einen sechsgliedrigen cyclischen Uebergangszustand H_2O ab und geht in Ion B(m/e 300; rel. Intens. 9,0 %) über. Diese Abspaltung von Wasser aus geladenen Radikalen ist typisch für substituierte Salicylate [38a]. Bruchstück C mit m/e 188 ("base peak") und Bruchstück D mit m/e 112 (rel. Intens. 59,6 %) entstehen möglicherweise durch eine β-Spaltung mit Transfer eines γ-H-Atoms (McLafferty-Umlagerung; vgl. [38b]). Bruchstück C geht unter Verlust von CO in Ion E (m/e 160; rel. Intens. 11,5 %) über.

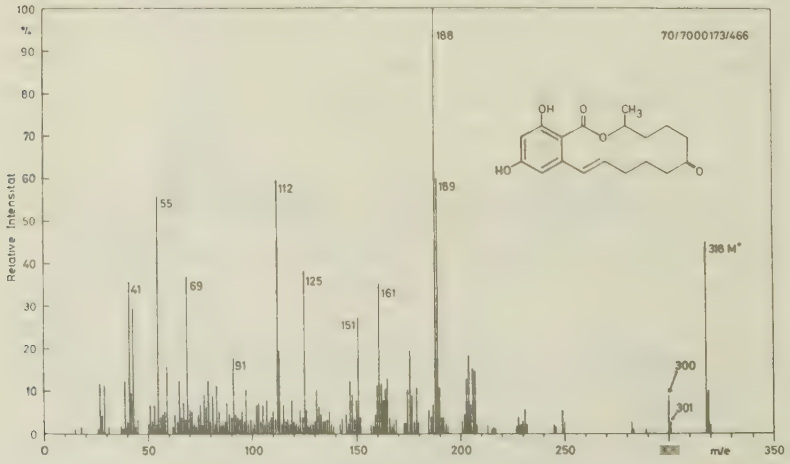
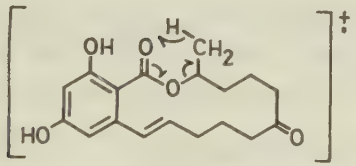


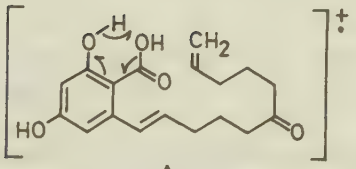
Fig. 8: Massenspektrum von Zearalenon (1)

Formelschema 1: Zerfall von Zearalenon (1)



M⁺

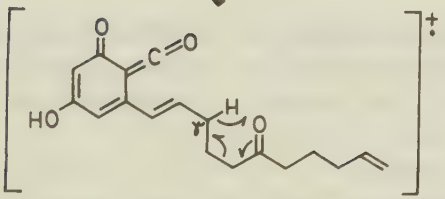
m/e 318 (42,7%)



A

m/e 318 (42,7%)

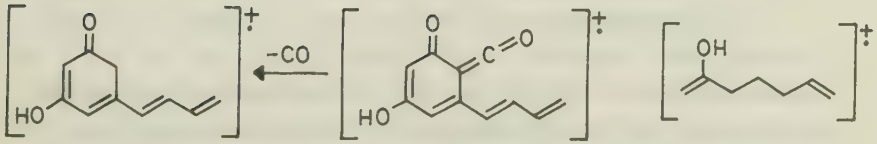
$-H_2O$



B

m/e 300 (9,0%)

$-e$



E

m/e 160 (11,5%)

C

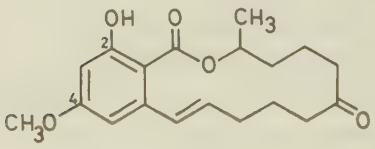
m/e 188 (100%)

D

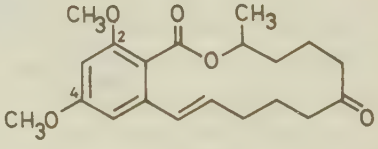
m/e 112 (59,6%)

Eine weitere charakteristische Bruchstückfolge soll im Zusammenhang mit dem Dimethyläther 5 von Zearalenon diskutiert werden (vgl. Formelschema 2 und Tab. VIII).

Zur weiteren Charakterisierung, insbesondere auch, um weiteres Vergleichsmaterial für die Spektralanalyse zu erhalten, wurde Zearalenon (1) mit Methyljodid und K_2CO_3 in Aceton umgesetzt. Es resultierten der 4-Monomethyläther 4 und der Dimethyläther 5 im Verhältnis 1:2.



4



5

4-O-Methyl-zearalenon (4) kristallisiert aus Methanol, das eine Spur Wasser enthält, in farblosen Blättchen vom Smp. 120 - 122°; $[\alpha]_D^{24} = -176{,}7° \pm 1°$ (Chloroform).

Das UV.-Spektrum von 4 in Äthanol zeigt, dass die Lage der Absorptionsmaxima durch die Methylgruppe in 4-Stellung nicht beeinflusst wird. Wir finden das Hauptmaximum wiederum bei 236 nm. Die Banden bei 273 und 314 nm erleiden, in Uebereinstimmung mit dem UV.-Spektrum von 1, unter dem Einfluss von $AlCl_3$ eine bathochrome Verschiebung von 11 resp. 22 nm, was die 4-Stellung der Methoxygruppe beweist.

Das IR.-Spektrum von 4 (fest in KBr) bestätigt die für 1 vorgenommene Zuordnung der Carbonylfunktionen. Bei 1708 cm^{-1} finden wir die Streckschwingung für die Keto-Carbonylgruppe und bei 1642 cm^{-1} diejenige für die Ester-Carbonylgruppe.

Im NMR.-Spektrum von 4 (in $CDCl_3$) (vgl. Tab. X) ist das

Signal der 4-Hydroxygruppe nicht mehr vorhanden. Damit im Einklang steht das Auftreten eines scharfen Singuletts (3H) bei 3,83 ppm, das von der Methoxygruppe in 4-Stellung herrührt.

Wird das Spektrum in Deuterobenzol aufgenommen, so verschiebt sich das Methoxysignal um 0,6 ppm nach 3,23 ppm.

Die charakteristische Verschiebung eines Methoxysignals unter dem Einfluss eines aromatischen anisotropen Lösungsmittels nach höherem Feld, zeigt, dass sich in ortho-Stellung mindestens ein Wasserstoffatom befinden muss [39]. Ist die aromatische Methoxygruppe in beiden ortho-Positionen von sauerstoffhaltigen Substituenten flankiert, so ändert sich die Lage ihres Signals nur geringfügig.

Das Massenspektrum von 4 zeigt den gleichen charakteristischen Zerfall wie für Zearalenon (1). Entsprechend finden wir die aromatischen Bruchstücke bei einer um 14 Einheiten höheren Masse (vgl. Tab. VIII).

2,4-Di-O-methyl-zearalenon (5) kristallisiert aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 113 - 114°. Der optische Drehwert ist stark vom Lösungsmittel abhängig und interessanterweise positiv: $[\alpha]_D^{24}$ = + 49,8 ° ± 1° (Chloroform); $[\alpha]_D^{24}$ = + 24,7° ± 1° (Methanol).

Im UV.-Spektrum von 5 in Äthanol lassen sich wiederum drei Banden erkennen. Durch die Methylierung der 2-Hydroxygruppe ist die intramolekulare Wasserstoffbrücke aufgehoben worden, was eine hypsochrome Verschiebung [40a] der Absorptionen zur Folge hat. Entsprechend finden wir Maxima bei 223 nm (log ε = 4,48), 256 nm (sh; 4,13) und 298 nm (3,38). Zugabe von $AlCl_3$ beeinflusst das UV.-Spektrum von 5 nicht.

Im IR.-Spektrum von 5 (fest in KBr) ist die Schwingung bei 1642 cm^{-1} verschwunden; dafür erkennt man eine neue Bande bei 1726 cm^{-1}, was mit einer nicht assoziierten Ester-Carbonyl-

gruppe vereinbar ist. Die Streckschwingung der Ketogruppe erscheint unverändert bei 1708 cm^{-1}.

Im NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) (vgl. Tab. X) findet man die Signale der beiden Methoxygruppen bei 3,84 ppm und 3,82 ppm als scharfe drei-Protonen-Singuletts. Es lässt sich nicht entscheiden, welches Signal welcher Methoxygruppe entspricht. Beim Wechsel von $CDCl_3$ nach C_6D_6 als Lösungsmittel werden sie nach 3,41 ppm und 3,30 ppm verschoben.

Im Massenspektrum von 5 lässt sich eine weitere Bruchstückfolge erkennen, wie sie auch - etwas weniger ausgeprägt - im Massenspektrum von 1 und 4 zu finden ist (vgl. Formelschema 2 und Tab. VIII).

Das Molekel-Ion mit der Masse 346 (rel. Intens. 17,4 %) zerfällt wiederum durch homolytische C-O-Spaltung verbunden mit einer H-Wanderung eines zum Sauerstoff β-ständigen H-Atoms in das offenkettige Ion A" mit der gleichen Masse m/e 346.

Abspaltung von H_2O würde zum Ion B" führen, ist aber auf Grund der Methoxygruppe in 2-Stellung weniger wahrscheinlich als im Falle von 1 und 4, wo die 2-Stellung durch eine Hydroxygruppe substituiert ist.

Vielmehr erfolgt Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals [38c] zum Acylium-Ion F" mit m/e 329 und der relativen Intensität 3,2 %.

Durch eine McLafferty-Umlagerung [38b] geht Fragment-Ion F" in die Bruchstücke G" mit m/e 217 ("base peak") und D mit m/e 112 (rel. Intens. 15,6 %) über.

Das Acylium-Ion G" ergibt unter Abspaltung von CO das Fragment-Ion H" mit m/e 189 (rel. Intens. 96,4 %).

In Tabelle VIII sind die wesentlichsten korrespondierenden Bruchstücke von 1, 4 und 5 zusammengestellt.

Signal der 4-Hydroxygruppe nicht mehr vorhanden. Damit im Einklang steht das Auftreten eines scharfen Singuletts (3H) bei 3,83 ppm, das von der Methoxygruppe in 4-Stellung herrührt.

Wird das Spektrum in Deuterobenzol aufgenommen, so verschiebt sich das Methoxysignal um 0,6 ppm nach 3,23 ppm.

Die charakteristische Verschiebung eines Methoxysignals unter dem Einfluss eines aromatischen anisotropen Lösungsmittels nach höherem Feld, zeigt, dass sich in ortho-Stellung mindestens ein Wasserstoffatom befinden muss [39]. Ist die aromatische Methoxygruppe in beiden ortho-Positionen von sauerstoffhaltigen Substituenten flankiert, so ändert sich die Lage ihres Signals nur geringfügig.

Das Massenspektrum von 4 zeigt den gleichen charakteristischen Zerfall wie für Zearalenon (1). Entsprechend finden wir die aromatischen Bruchstücke bei einer um 14 Einheiten höheren Masse (vgl. Tab. VIII).

2,4-Di-O-methyl-zearalenon (5) kristallisiert aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 113 - 114°. Der optische Drehwert ist stark vom Lösungsmittel abhängig und interessanterweise positiv: $[\alpha]_D^{24}$ = + 49,8 ° ± 1° (Chloroform); $[\alpha]_D^{24}$ = + 24,7° ± 1° (Methanol).

Im UV.-Spektrum von 5 in Äthanol lassen sich wiederum drei Banden erkennen. Durch die Methylierung der 2-Hydroxygruppe ist die intramolekulare Wasserstoffbrücke aufgehoben worden, was eine hypsochrome Verschiebung [40a] der Absorptionen zur Folge hat. Entsprechend finden wir Maxima bei 223 nm (log ε = 4,48), 256 nm (sh; 4,13) und 298 nm (3,38). Zugabe von $AlCl_3$ beeinflusst das UV.-Spektrum von 5 nicht.

Im IR.-Spektrum von 5 (fest in KBr) ist die Schwingung bei 1642 cm^{-1} verschwunden; dafür erkennt man eine neue Bande bei 1726 cm^{-1}, was mit einer nicht assoziierten Ester-Carbonyl-

gruppe vereinbar ist. Die Streckschwingung der Ketogruppe erscheint unverändert bei 1708 cm^{-1}.

Im NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) (vgl. Tab. X) findet man die Signale der beiden Methoxygruppen bei 3,84 ppm und 3,82 ppm als scharfe drei-Protonen-Singuletts. Es lässt sich nicht entscheiden, welches Signal welcher Methoxygruppe entspricht. Beim Wechsel von $CDCl_3$ nach C_6D_6 als Lösungsmittel werden sie nach 3,41 ppm und 3,30 ppm verschoben.

Im Massenspektrum von 5 lässt sich eine weitere Bruchstückfolge erkennen, wie sie auch - etwas weniger ausgeprägt - im Massenspektrum von 1 und 4 zu finden ist (vgl. Formelschema 2 und Tab. VIII).

Das Molekel-Ion mit der Masse 346 (rel. Intens. 17,4 %) zerfällt wiederum durch homolytische C-O-Spaltung verbunden mit einer H-Wanderung eines zum Sauerstoff β-ständigen H-Atoms in das offenkettige Ion A" mit der gleichen Masse m/e 346.

Abspaltung von H_2O würde zum Ion B" führen, ist aber auf Grund der Methoxygruppe in 2-Stellung weniger wahrscheinlich als im Falle von 1 und 4, wo die 2-Stellung durch eine Hydroxygruppe substituiert ist.

Vielmehr erfolgt Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals [38c] zum Acylium-Ion F" mit m/e 329 und der relativen Intensität 3,2 %.

Durch eine McLafferty-Umlagerung [38b] geht Fragment-Ion F" in die Bruchstücke G" mit m/e 217 ("base peak") und D mit m/e 112 (rel. Intens. 15,6 %) über.

Das Acylium-Ion G" ergibt unter Abspaltung von CO das Fragment-Ion H" mit m/e 189 (rel. Intens. 96,4 %).

In Tabelle VIII sind die wesentlichsten korrespondierenden Bruchstücke von 1, 4 und 5 zusammengestellt.

Formelschema 2: Zerfall von 2,4-Di-O-methyl-zearalenon (5)

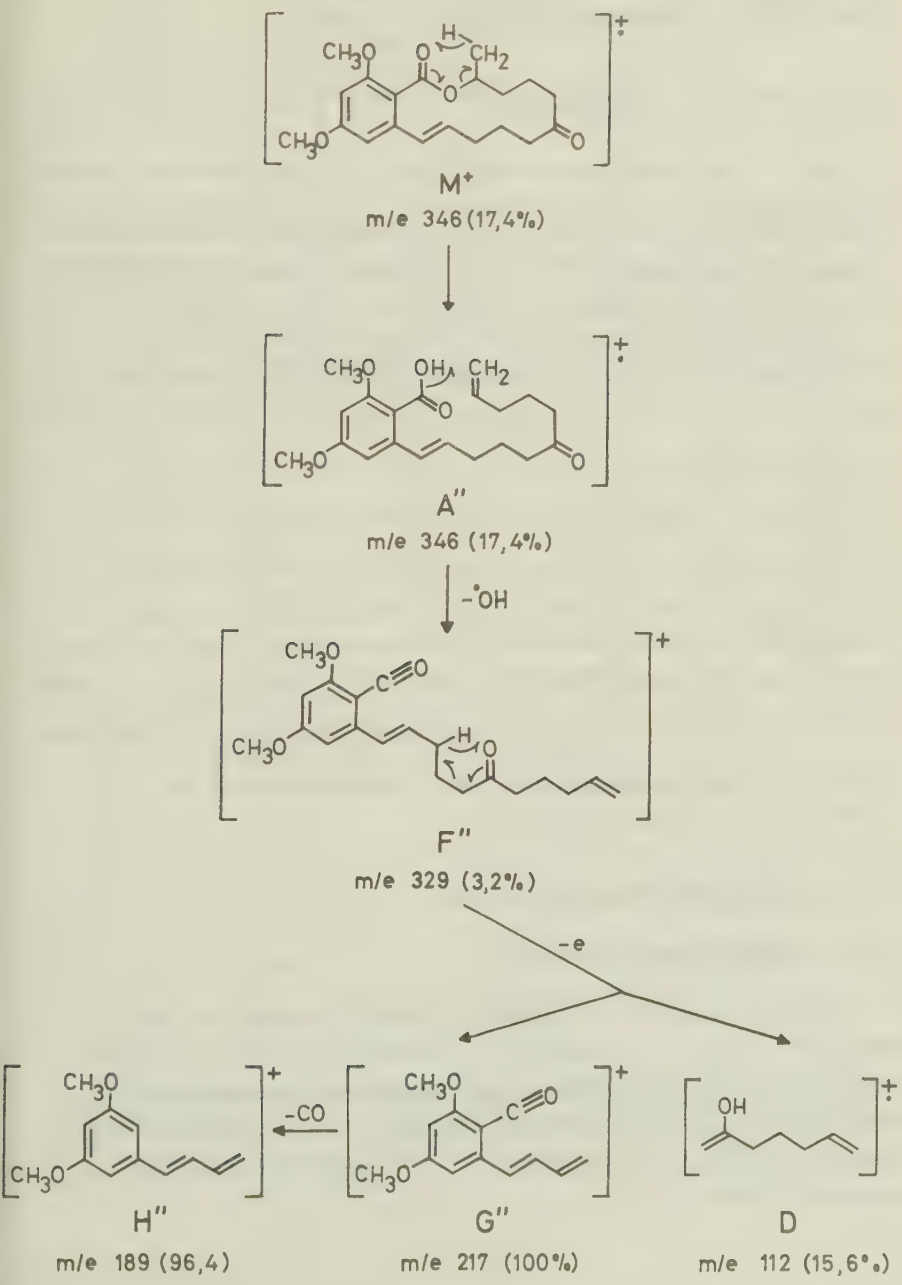


Tabelle VIII: Massenspektren von 1, 4 und 5

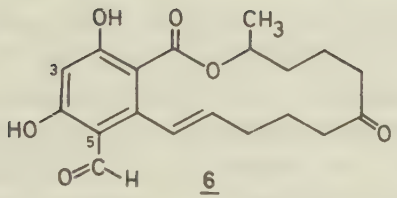
1			4			5		
m/e	Fragment	%	m/e	Fragment	%	m/e	Fragment	%
318	$C_{18}H_{22}O_5$	42,7	332	$C_{19}H_{24}O_5$	28,8	346	$C_{20}H_{26}O_5$	17,4
301	$C_{18}H_{21}O_4$	2,3	315	$C_{19}H_{23}O_4$	3,0	329	$C_{20}H_{25}O_4$	3,2
300	$C_{18}H_{20}O_4$	9,0	314	$C_{19}H_{22}O_4$	12,2	328	$C_{20}H_{24}O_4$	16,9
189	$C_{11}H_9O_3$	56,2	203	$C_{12}H_{11}O_3$	68,2	217	$C_{13}H_{13}O_3$	100,0
188	$C_{11}H_8O_3$	100,0	202	$C_{12}H_{10}O_3$	100,0	216	$C_{13}H_{12}O_3$	4,6
161	$C_{10}H_9O_2$	35,4	175	$C_{11}H_{11}O_2$	38,2	189	$C_{12}H_{13}O_2$	96,4
160	$C_{10}H_8O_2$	11,5	174	$C_{11}H_{10}O_2$	10,6	188	$C_{12}H_{12}O_2$	5,5
112	$C_7H_{12}O$	59,6	112	$C_7H_{12}O$	24,6	112	$C_7H_{12}O$	15,6
*179	$C_9H_7O_4$	10,2	*193	$C_{10}H_9O_4$	12,9	*207	$C_{11}H_{11}O_4$	33,9

* aromatisches Bruchstück, das durch Fragmentierung der C-2'-C-3'- Bindung entsteht.

3.3. Struktur der neuen Metabolite

3.3.1. 5-Formyl-zearalenon (6)

Der neue Metabolit bildet farblose Plättchen vom Smp. 188 - 190°; $[\alpha]_D^{24} = -42,0° \pm 1°$ (Chloroform). Auf Grund der spektroskopischen und chemischen Eigenschaften, sowie durch Vergleich mit dem synthetisch hergestellten isomeren 3-Formyl--zearalenon (7) (vgl. S. 47) wird dem Stoffwechselprodukt Struktur 6 erteilt.



6

Aus dem UV.-Spektrum von 6 (vgl. Fig. 9) lässt sich eine verwandtschaftliche Beziehung zu 1 nicht ableiten. Als Resultat zahlreicher Ueberlagerungseffekte elektronisch komplementärer und nicht komplementärer Gruppen findet man Banden bei 217 nm (log ε = 4,16), 254 nm (4,49), 282 nm (sh; 4,00) und 317 nm (3,72).

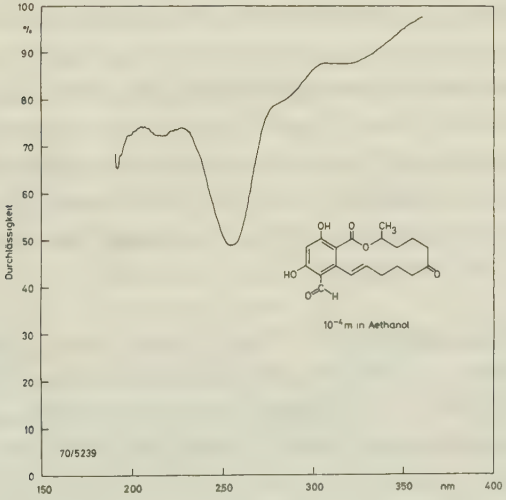


Fig. 9: UV.-Absorptionsspektrum von 5-Formyl-zearalenon (6)

Im IR.-Spektrum (fest in KBr) weist eine sehr breite Bande im Bereich von 3427 - 2727 cm^{-1} auf stark assoziierte Hydroxylgruppen hin. Die Bande wird zum Teil überlagert durch die Streckschwingungen der CH_2- und CH-Gruppen bei 2960 cm^{-1}. Die Absorption der Keto-Carbonylgruppe verursacht eine Schwingung bei 1701 cm^{-1}. Die Banden bei 1666 und 1631 cm^{-1} lassen sich nicht eindeutig zuordnen. Sie werden verursacht durch die Ester- und Aldehydgruppe. Die tiefen Werte sind auch hier durch Wasserstoffbrücken zu den Hydroxylgruppen in 2- und 4-Stellung zu erklären. Aromatenbanden liegen bei 1613 und 1569 cm^{-1}.

Das hochaufgelöste Massenspektrum (vgl. Tab. IX) zeigt eine Spitze für das Molekel-Ion bei m/e 346,1427 ± 0,01 (rel. Intens. 93,2 %). Als Bruttoformel kommt damit nur $C_{19}H_{22}O_6$ in Frage. Durch Verlust von CO (m/e 28; rel. Intens. 58,3 %) entsteht das Fragment-Ion m/e 318 (rel. Intens. 5,0 %), was für einen aromatischen Aldehyd spricht. Das Auftreten der gleichen Bruchstückfolge wie in Zearalenon (1) lässt auf eine identische Struktur des Lactonrings schliessen. Erwähnenswert ist das Erscheinen des "base peak" bei m/e 207 ($C_{10}H_7O_5$) und nicht wie man auf Grund der beiden postulierten Mechanismen erwartet würde bei m/e 216 oder m/e 217. Möglicherweise ist die bevorzugte Fragmentierung der C-2'-C-3'-Bindung dem Einfluss der Formyl-Gruppe in 5-Stellung zuzuschreiben.

Das NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) (vgl. Fig. 10 und Tab. X) zeigt zwei scharfe Ein-Protonen-Singuletts bei 12,62 und 12,58 ppm, die durch D_2O-Zugabe zum Verschwinden gebracht werden. Sie sind den beiden durch Wasserstoffbrücken fixierten Hydroxylgruppen zuzuordnen. Das Signal für das Aldehyd-Proton findet man bei 9,81 ppm ebenfalls als Singulett. Das C-1'-Vinylproton erscheint als Dublett bei 7,00 ppm mit J = 16 Hz. Für das Singulett bei 6,42 ppm ist das aromatische Proton an C-3 verantwortlich. Die weitere Zuordnung der einzelnen Protonen erfolgte auf Grund von Doppelresonanzversuchen:

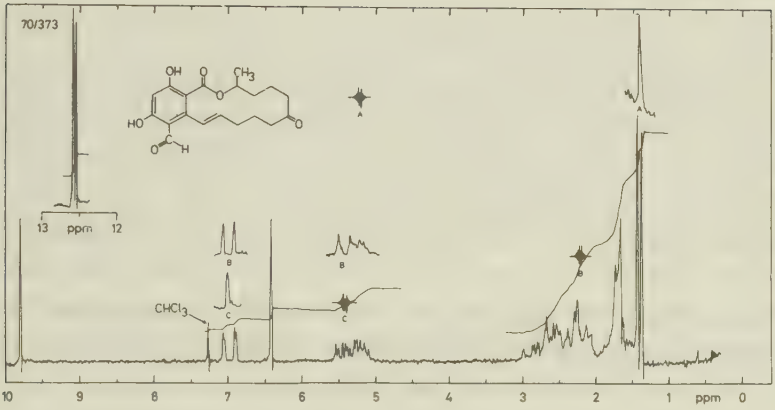


Fig. 10: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 5-Formyl-zearalenon (6) in $CDCl_3$ (Einstrahlversuche)

Im Bereich von 5,06 - 5,60 ppm lassen sich zwei komplexe Signalgruppen erkennen, die nach der Integrationskurve zwei Protonen entsprechen. Wird auf das Signal bei 5,20 ppm eingestrahlt, so wird das bei 1,42 ppm erscheinende Dublett (3H, J = 6 Hz) zu einem Singulett. Auf Grund dieser Tatsache darf das Multiplett, dessen Zentrum bei 5,20 ppm liegt, dem C-10'-Methinproton und das Dublett bei 1,42 ppm den Methylprotonen an C-11' zugeordnet werden. Die Signalgruppe mit dem Zentrum bei 5,43 ppm entspricht demnach dem Vinylproton an C-2'. Ein weiteter Entkopplungsversuch bestätigt diese Interpretation: Wird bei 2,25 ppm, dem ungefähren Bereich für die allylischen Methylenprotonen an C-3' eingestrahlt, so verwandelt sich das komplexe Signal bei 5,43 ppm in ein Dublett mit J = 16 Hz, was der trans-Kopplung mit dem Vinylproton an C-1' entspricht. Beim Einstrahlen an der Stelle des Vinylprotons bei 5,43 ppm (C-2') verändert sich das C-1'-Dublett bei 7,00 ppm in ein Singulett.

Es ist bemerkenswert, dass das C-2'-Vinylproton um 0,26 ppm bei höherem Feld erscheint als im Spektrum von Zearalenon (1). Unabhängig von der Stellung der Aldehydgruppe würde man auf Grund zusätzlicher Feldeffekte für die in der Ringebene des Aromaten liegenden Protonen eher eine paramagnetische Verschiebung erwarten. Eine mögliche Erklärung für das Erscheinen des C-2'-Protons bei höherem Feld ergibt sich aus Modellbetrachtungen. Es lässt sich nämlich zeigen, dass aus sterischen Gründen entweder die Aldehydgruppe oder das C-2'-Proton etwas aus der Ringebene herausgedreht werden muss, damit die gegenseitige Beeiflussung durch Van der Waals-Kräfte möglichst gering bleibt. In beiden Fällen würde man eine Verschiebung des C-2'-Protons nach höherem Feld erwarten.

Mit den obigen physikalischen Daten ist die Struktur von 6 noch nicht gesichert, insbesondere erlauben sie keine eindeutige Entscheidung über die Stellung der Formylgruppe. Nur ein direkter Vergleich mit den beiden möglichen Isomeren kann darüberAufschluss geben. Im folgenden wird die Synthese dieser beiden Verbindungen beschrieben.

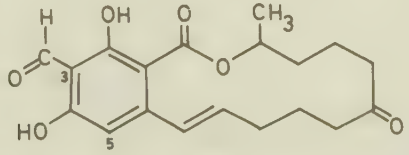
Um zu erwartende Schwierigkeiten bei der Auftrennung der in ihrer Polarität kaum differierenden Isomeren zum vorneherein auszuschalten, wurde nach Methoden gesucht, mit denen jeweils ein Isomeres bevorzugt gebildet werden sollte.

Wurde Zearalenon (1) in 10-prozentiger Natronlauge mit einem Ueberschuss an Chloroform während vier Stunden nach Reimer-Tiemann [41] umgesetzt, so liess sich ein Formyl-zearalenon in einer Ausbeute von 5 % gewinnen, das nach Schmelzpunkt, Misch-Smp., Dünnschichtchromatogramm, optischer Drehung, UV.-. IR.-, NMR.- und Massenspektrum mit dem natürlichen Formylderivat des Zearalenons identisch war. Das Isomere (7) konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Die schlechte Ausbeute ist nicht überraschend, da die Formylierung nach dieser Methode bei hochsubstituierten Phenolen im allgemeinen schlecht

verläuft [42], vor allem dann, wenn der Benzolring durch elektronenziehende Substituenten desaktiviert ist [42].

Die Aldehydsynthese nach Gattermann-Adams in der modifizierten Form von Shah und Laiwalla [43], [44], [45] sollte hauptsächlich zu 3-Formyl-zearalenon (7) führen. Bei der Umsetzung von Zearalenon (1) mit 2 Mol $Zn(CN)_2$ und 2 Mol $AlCl_3$ in abs. Äther unter Einleiten von HCl-Gas erhielt man die beiden Isomeren 6 und 7 etwa im Verhältnis 1:2. Die Gesamtausbeute betrug 89 % der Theorie.

Das synthetische isomere Produkt, dem wir die Struktur des 3-Formyl-zearalenons (7) zuordnen, kristallisiert aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 171 - 172°; $[\alpha]_D^{24}$ = - 130,2° ± 1° (Chloroform).



7

Im UV.-Spektrum von 7 in Äthanol (vgl. Fig. 11) erscheinen Maxima bei 250 nm (log ε = 4,46); 302 nm (4,37) und 350 nm (3,79). Die im Durchschnitt bei längeren Wellenlängen und mit grösserer Intensität erscheinenden Banden deuten auf eine Verlängerung des chromophoren Systems hin. Diese Tatsache ist mit einer Formylgruppe in 3-Stellung gut vereinbar, wenn man annimmt, dass mindestens einer der für die Absorption verantwortlichen π-π^*-Uebergänge durch die para-Konjugation der 3-Formylgruppe mit der Doppelbindung an C-1' verursacht wird.

Das IR.-Spektrum (fest in KBr) unterscheidet sich nur geringfügig von demjenigen von 6. Im Bereich von 3377 - 2600

cm^{-1} finden wir wiederum die breite Bande der assoziierten Hydroxylgruppen und bei 1693 cm^{-1} die Schwingung der Keto-Carbonylgruppe. Die Absorptionen für die stark verbrückte Aldehyd- und Esterfunktion erscheinen zusammen als breite Bande bei 1626 cm^{-1}, also etwas tiefer als im Spektrum von 6.

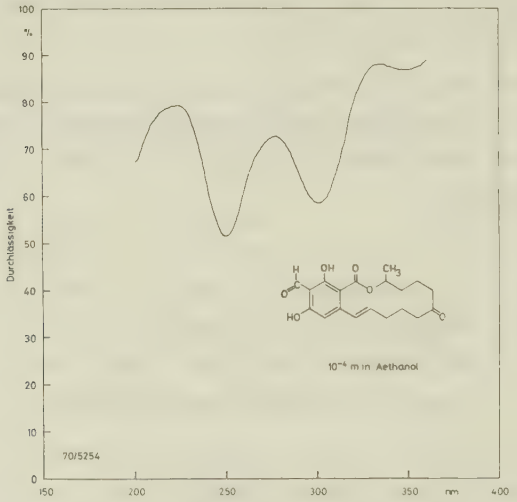


Fig. 11: UV.-Absorptionsspektrum von 3-Formyl-zearalenon (7)

Im NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$) (vgl. Fig. 12 und Tab. X) findet man vor allem zwei signifikante Unterschiede zum Spektrum von 6, die gut mit einer Formylgruppe in 3-Stellung korreliert werden können. Das Aldehydproton erscheint um 0,55 ppm bei tieferem Feld, nämlich bei 10,36 ppm. Die bemerkenswert tiefe Lage ist durch starke Assoziationen zu den ortho-ständigen Hydroxylgruppen erklärbar.

Das C-2'-Vinylproton findet man als komplexes Signal (J = 4,5 Hz; J = 9 Hz und J = 16 Hz) bei 5,88 ppm, also relativ zu Zearalenon (1) um 0,19 ppm nach tieferem Feld verschoben. Eine paramagnetische Verschiebung ist aber nur möglich, wenn das Proton an C-2' in der Ringebene liegt. Wie Modellbetrachtungen zeigen, ist die Coplanarität des π-Systems nur dann gewährleistet, wenn die Formylgruppe in 3-Stellung steht.

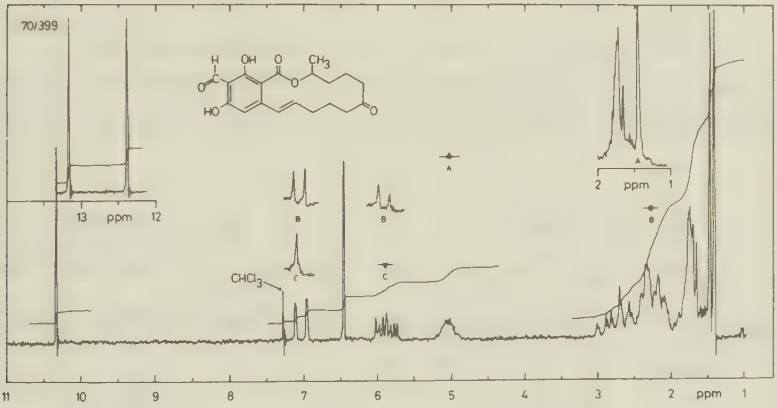


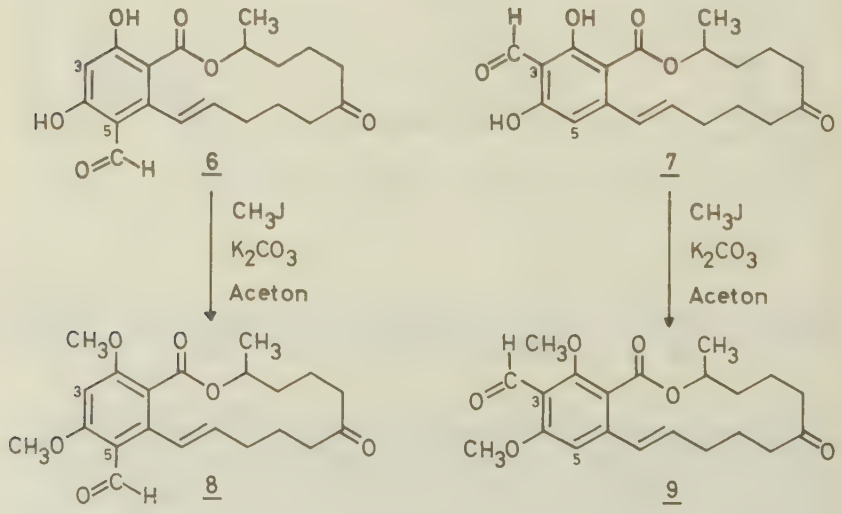
Fig. 12: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 3-Formyl-zearalenon (7) in $CDCl_3$ (Einstrahlversuche)

Im hochaufgelösten Massenspektrum (vgl. Tab. IX) finden wir das Molekel-Ion, in Uebereinstimmung mit der Bruttoformel $C_{19}H_{22}O_6$, bei m/e 346,141345 ± 0,008. Interessanterweise erscheint der "base peak" bei m/e 217 und nicht wie im Spektrum von 6 bei m/e 207. Die Fragmentierung der C-2'-C-3'-Bindung ist im Falle von 7 offensichtlich weniger wahrscheinlich. Das entsprechende Bruchstück mit der Masse 207 tritt nur

mit einer relativen Intensität von 16,3 % auf. In Tabelle IX sind die wesentlichsten Fragment-Ionen der beiden Isomeren 6 und 7 einander gegenübergestellt.

Durch die Synthese der beiden Formylderivate des Zearalenons ist bewiesen, dass das natürliche Isomere eine am Benzolring haftende Formylgruppe besitzt, wobei die 5-Stellung auf Grund der bisherigen Ergebnisse sehr wahrscheinlich ist. Den Beweis für die vorgenommene Zuordnung liefern die NMR.-Spektren (in $CDCl_3$ und C_6D_6) der Dimethyläther 8 und 9 von 5-Formyl-zearalenon (6) resp. 3-Formyl-zearalenon (7).

Die Umsetzung von 6 resp. 7 mit einem Ueberschuss an Methyljodid und K_2CO_3 in Aceton in der Wärme ergab die beiden Dimethyläther in Ausbeuten von etwa 80 % (vgl. Formelschema 3).



Formelschema 3

Tabelle IX: Massenspektren der Formylzearalenone 6 und 7

6			7		
m/e	Fragment	%	m/e	Fragment	%
346	$C_{19}H_{22}O_6$	93,2	346	$C_{19}H_{22}O_6$	73,7
329	$C_{19}H_{21}O_5$	1,3	329	$C_{19}H_{21}O_5$	3,1
328	$C_{19}H_{20}O_5$	5,6	328	$C_{19}H_{20}O_5$	10,8
217	$C_{12}H_9O_4$	18,5	217	$C_{12}H_9O_4$	100,0
216	$C_{12}H_8O_4$	16,4	216	$C_{12}H_8O_4$	17,8
189	$C_{11}H_9O_3$	67,5	189	$C_{11}H_9O_3$	8,9
188	$C_{11}H_8O_3$	5,0	188	$C_{11}H_8O_3$	13,9
161	$C_{10}H_9O_2$	5,0	161	$C_{10}H_9O_2$	3,9
160	$C_{10}H_8O_2$	2,7	160	$C_{10}H_8O_2$	3,1
112	$C_7H_{12}O$	33,2	112	$C_7H_{12}O$	41,1
*318	$C_{18}H_{22}O_5$	5,0	318	$C_{18}H_{22}O_5$	1,6
**207	$C_{10}H_7O_5$	100,0	207	$C_{10}H_7O_5$	16,3
***179	$C_9H_7O_4$	1,5	179	$C_9H_7O_4$	1,5

* m/e 346 (M^+) -CO

** aromatisches Bruchstück, das durch Fragmentierung der C-2'-C-3'-Bindung entsteht.

*** m/e 207-CO

Im NMR.-Spektrum von 8 (in $CDCl_3$) (vgl. Fig. 13 und Tab. X) findet man die Signale der beiden Methoxygruppen bei 3,98 und 3,95 ppm. Beim Wechsel von $CDCl_3$ zu C_6D_6 als Lösungsmittel verschieben sich beide Signale nach höherem Feld. Sie sind als Singulett, das nach der Integrationskurve sechs Protonen entspricht, bei 3,25 ppm wieder zu erkennen (vgl. Fig. 14 und Tab.X).

Diese beachtliche diamagnetische Verschiebung bedeutet, dass sich in ortho-Stellung zu beiden Methoxygruppen ein Proton befinden muss und folglich die Formylgruppe in 5-Stellung sitzt (vgl. [39]).

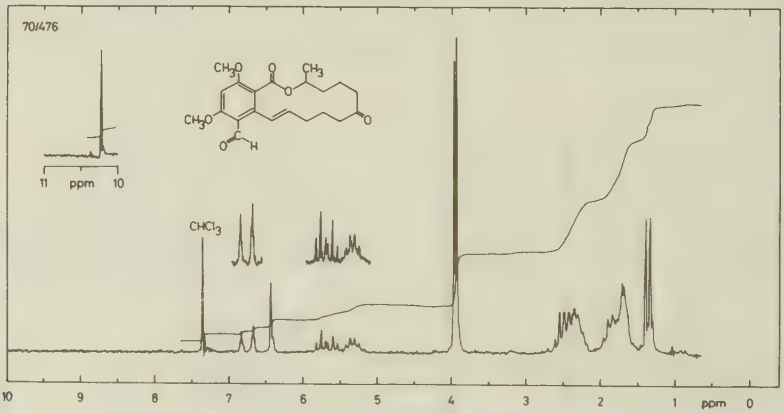


Fig. 13: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-5-formyl-zearalenon (8) in $CDCl_3$

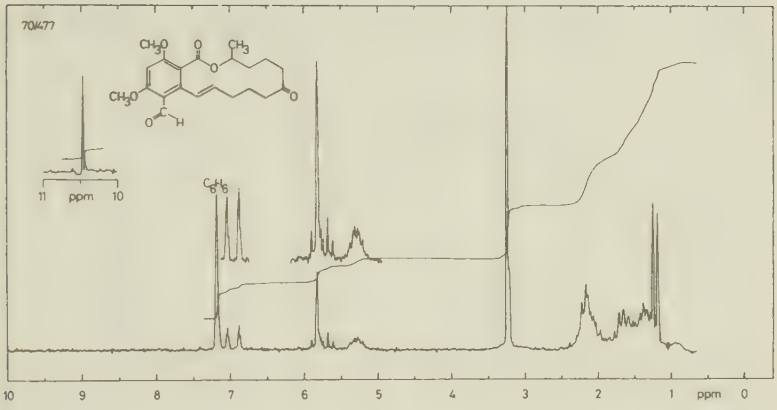


Fig. 14: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-5-formyl-zearalenon (8) in C_6D_6

Anders verhält sich der Dimethyläther 9. Die chemischen Verschiebungen der beiden Methoxygruppen in $CDCl_3$ betragen 3,99 und 3,93 ppm (vgl. Fig. 15 und Tab. X). Wird das Spektrum in C_6D_6 aufgenommen, so zeigt nur eine der beiden Gruppen eine starke Verschiebung nach höherem Feld. Wir finden die beiden Singuletts bei 3,90 und 3,24 ppm (vgl. Fig. 16 und Tab. X). Dieses unterschiedliche Verhalten beweist, dass sich die Formylgruppe in 3-Stellung befindet.

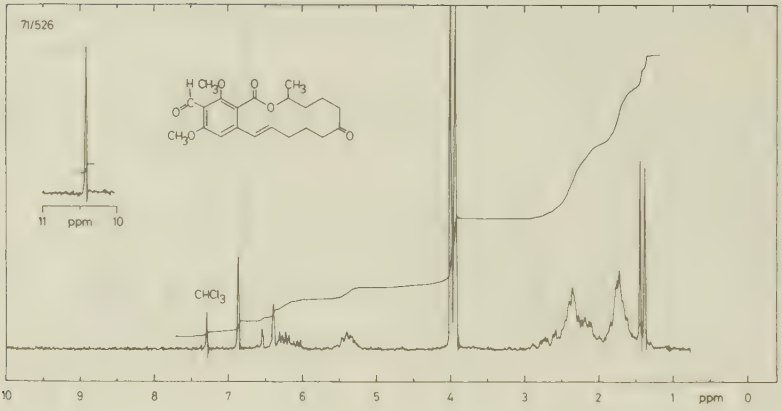


Fig. 15: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-3-formyl-zearalenon (9) in $CDCl_3$

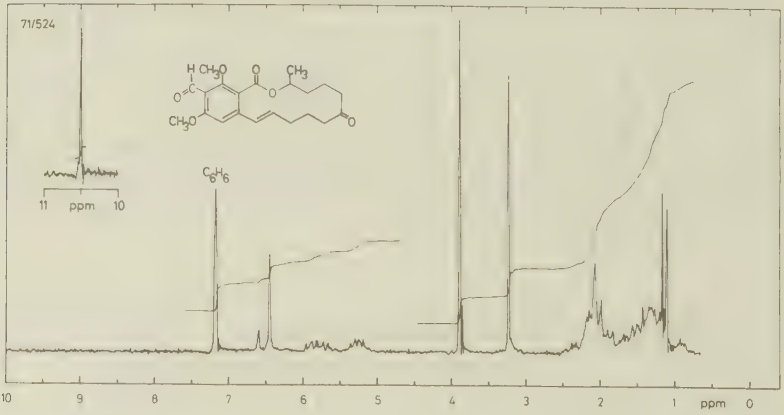


Fig. 16: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-3-formyl-zearalenon (9) in C_6D_6

Tabelle X: Zuordnung der H-Atome in den 100 MHz - NMR.-Spektren [1] von 1, 4, 5, 6, 7, 8 und 9

Verbindung	Lösungsmittel	2-OH	4-OH	2-OCH_3	4-OCH_3	[2] C-3 und C-5		C-1'	C-2'	C-10'	C-11'
		s	s	s	s	AB-System (J~2,5 Hz)		d(16)	m	m	d(6)
3	$CDCl_3$	12,12	7,26	-	-	6,47	6,39	7,02	5,69	5,10	1,40
4	$CDCl_3$	12,06	-	-	3,83	6,47	6,39	7,05	5,69	5,05	1,40
4	C_6D_6	14,71	-	-	3,23	6,62	6,51	7,04	5,47	4,79	1,04
5	$CDCl_3$	-	-	3,84 3,82		6,61	6,38	6,43	6,01	5,35	1,35
5	C_6D_6	-	-	3,41 3,30		6,57	6,20	6,57	5,78	5,28	1,18

Verbindung	Lösungsmittel	2-OH	4-OH	2-OCH_3	4-OCH_3	C-3	3-CHO	C-5	5-CHO	C-1'	C-2'	C-10'	C-11'
		s	s	s	s	s	s	s	s	d(16)	m	m	d(6)
6	$CDCl_3$	12,59 12,55		-	-	6,42	-	-	9,80	6,98	5,43	5,20	1,41
6	C_6D_6	13,13 12,99		-	-	6,64	-	-	9,53	6,44	4,80	4,80	0,98
7	$CDCl_3$	13,17 12,38		-	-	-	10,36	6,47	-	7,04	5,88	5,04	1,45
7	C_6D_6	13,41 12,88		-	-	-	10,33	6,43	-	6,81	5,40	4,68	1,02

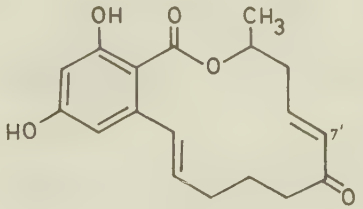
Verbindung	Lösungsmittel	2-OH	4-OH	$2\text{-}OCH_3$	$4\text{-}OCH_3$	C-3	3-CHO	C-5	5-CHO	C-1'	C-2'	C-10'	C-11'
		s	s	s	s	s	s	s	s	d(16)	m	m	d(6)
8	$CDCl_3$	-	-	3,98 3,95		6,44	-	-	10,23	6,76	5,69	5,35	1,37
8	C_6D_6	-	-	3,25 3,25		6,83	-	-	10,49	6,94	5,74	5,29	1,20
9	$CDCl_3$	-	-	3,93 3,99		-	10,41	6,86	-	6,46	6,20	5,39	1,41
9	C_6D_6	-	-	3,90 3,24		-	10,50	6,45	-	6,52	5,78	5,26	1,14

1) δ-Werte in ppm mit $Si(CH_3)_4$ (TMS) als internem Standard. Bei eindeutig erkennbaren Feinstrukturen bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett. In Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

2) Die Signale für die aromatischen Protonen an C-3 und C-5 können nicht spezifisch dem einen oder andern Wert zugeordnet werden.

3.3.2. 7'-Dehydro-zearalenon (10)

Dieses Stoffwechselprodukt von Gibberella zeae konnte nur in sehr geringer Menge isoliert werden. Es kristallisiert aus Aceton-Äther-(1:5) in farblosen Nadeln vom Smp. 197 - 200°; $[\alpha]_D^{24}$ = - 133,8 ± 1° (Chloroform). Die Struktur 10 folgt aus den spektralen Eigenschaften des Metaboliten.



10

Im UV.-Spektrum von 10 in Äthanol (vgl. Fig. 17) findet man Banden bei 229 nm (log ε = 4,45), 274 nm (3,97) und 313 nm (3,66). Das Erscheinen des Hauptmaximums bei 229 nm, also bei kürzeren Wellenlängen als im Spektrum von 1, ist auf eine Ueberlagerung des aromatischen Chromophors mit dem α,β-ungesättigten Keton zurückzuführen. Wäre die ungesättigte Ketofunktion allein verantwortlich für die Absorption, so würde man auf Grund von Berechnungen nach Scott [40b] die E.T.-Hauptbande bei 227 nm erwarten. Die Intensität der Bande spricht für eine transoide Anordnung des α,β-ungesättigten Ketons.

Im IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 18) lässt eine breite Bande bei 3360 cm^{-1} die beiden Hydroxylgruppen erkennen. Eine verbreiterte Schwingung bei 1654 cm^{-1} wird durch die Absorption der mit der Hydroxylgruppe in 2-Stellung verbrückten Ester-Carbonylgruppe und durch die Absorption der ungesättigten Ketofunktion verursacht. Die Verschiebung der 6'-Carbonyl-Streckschwingung von 1688 cm^{-1} (im Spektrum von 1)

nach niedrigeren Wellenzahlen ist charakteristisch für den ungesättigten Charakter des Ketons.

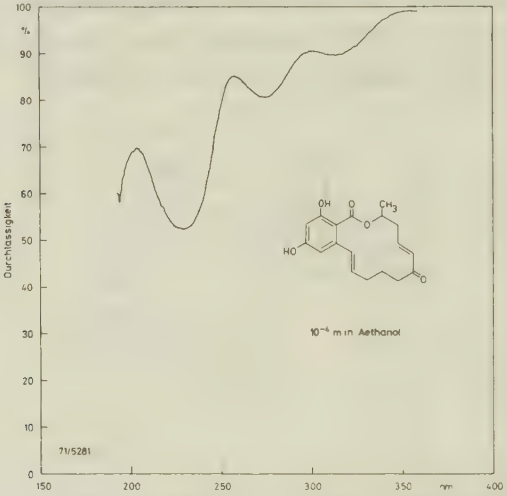


Fig. 17: UV.-Absorptionsspektrum von 7'-Dehydro-zearalenon (10)

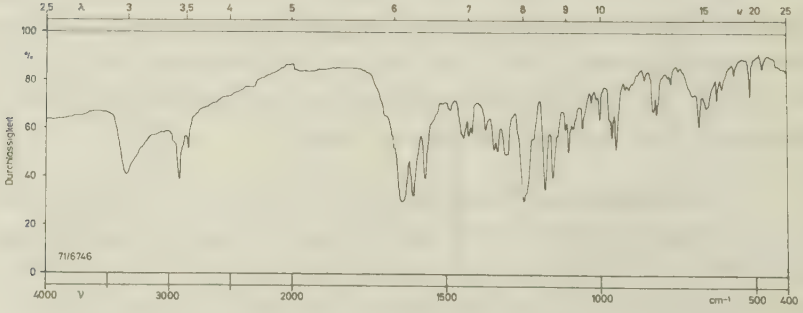


Fig. 18: IR.-Spektrum von 7'-Dehydro-zearalenon (10) in KBr

Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum von 10 (vgl. Fig.19) lässt sich eindeutig ableiten, dass die Struktur des Lactonteils, abgesehen von der Doppelbindung in 7'-Stellung, mit der von Zearalenon (1) identisch sein muss (vgl. Formelschema 4).

Das Molekel-Ion erscheint bei m/e 316,135076 ± 0,01 (rel. Intens. 29,7 %) und entspricht der Sommenformel $C_{18}H_{20}O_5$.

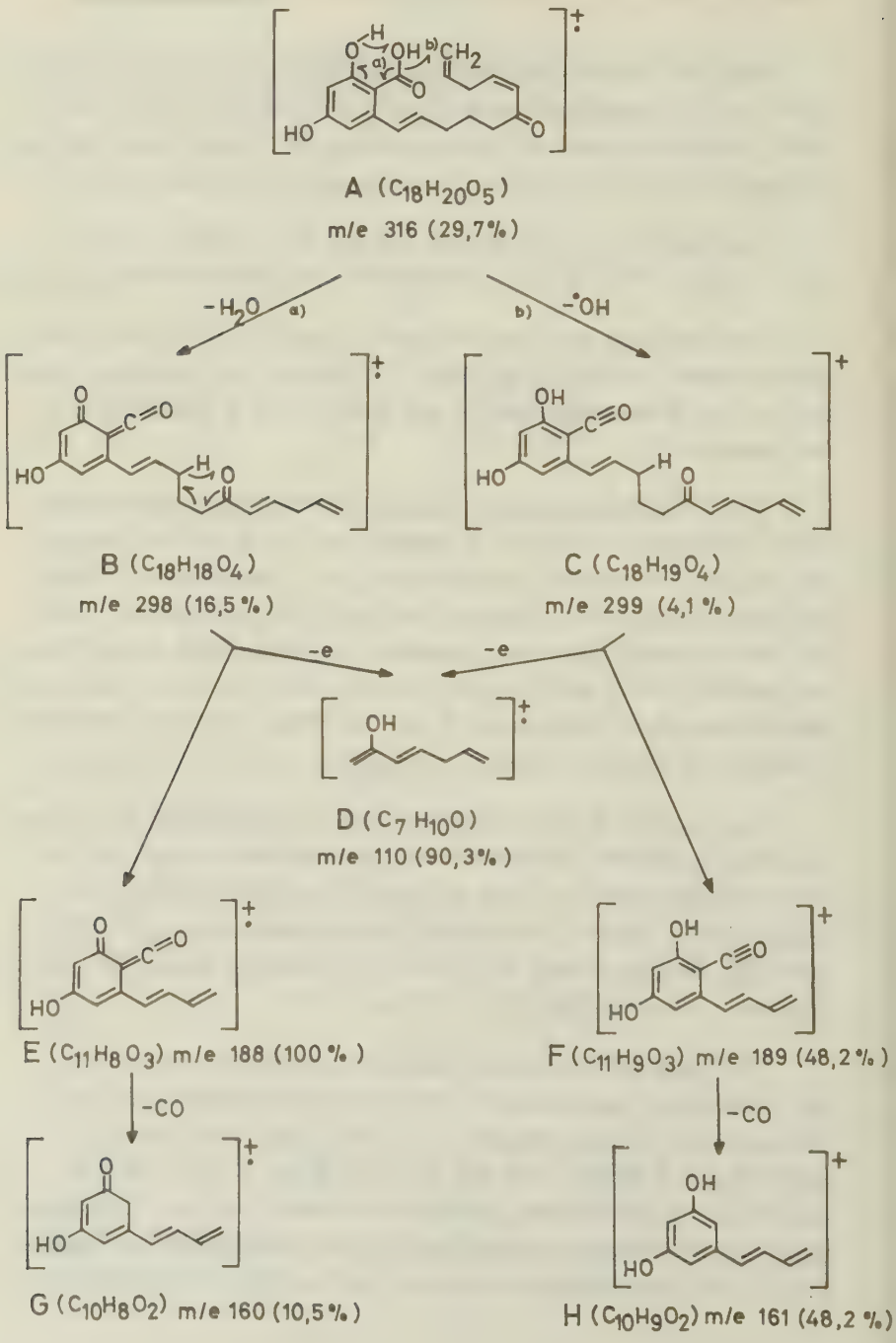
Die Oeffnung des Lactonrings erfolgt wiederum durch eine homolytische O-C-Spaltung unter H-Transfer via sechsgliedrigen, cyclischen Uebergangszustand und ergibt Ion A ebenfalls mit der Masse 316.

Für Bruchstück A sind folgende Zerfallsmechanismen möglich: Einerseits ergibt H_2O-Abspaltung Ion B mit der Masse 298 und der relativen Intensität 16,5 %, andererseits führt die Abspaltung eines Hydroxyl-Radikals zum Bruchstück C mit m/e 299 und der relativen Intensität 4,1 %. Durch McLafferty-Umlagerung erhält man aus den beiden Ionen (B und C) das gleiche aliphatische Bruchstück D mit der Masse 110 und der signifikanten relativen Intensität 90,3 %.

Das Auftreten dieses aliphatischen Bruchstücks mit einer so hohen relativen Intensität ist massenspektrometrisch ein eindeutiger Beweis für die C-5'-C-11'-Partialstruktur des Lactonrings. (Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, dass das entsprechende Bruchstück im Spektrum von 1 bei m/e 112 (rel. Intens. 59,6 %) zu finden ist.)

Die Beweisführung wird gestützt durch die beiden bei der Umlagerung entstehenden aromatischen Bruchstücke: Aus Fragment-Ion B entsteht Ion E mit m/e 188 ("base peak") und aus Ion C erhält man Ion F mit m/e 189 (rel. Intens. 48,2 %). Das Erscheinen dieser Bruchstücke ist nur erklärbar, wenn die Keto-Gruppe an C-6' sitzt und nicht nach C-5' konjugiert ist. Eine Doppelbindung an C-5' würde eine McLafferty-

Formelschema 4: Zerfall von 7'-Dehydro-zearalenon (10)



Umlagerung verhindern [38d].

Analog zu Zearalenon (1) führt CO-Abspaltung aus den Ionen E und F zu den Fragmenten G mit m/e 160 (rel. Intens. 10,5 %) resp. H mit m/e 161 (rel. Intens. 48,2 %).

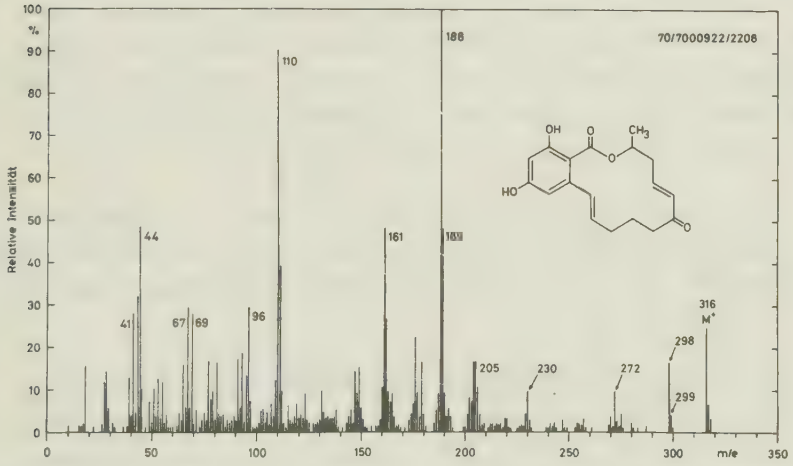


Fig. 19: Massenspektrum von 7'-Dehydro-zearalenon (10)

Im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur steht auch das NMR.-Spektrum von 10 (vgl.Fig. 20 und Tab. XIII).

In einem Gemisch von $CDCl_3$ und $(CD_3)_2CO$ (1:1) zeigt es ein scharfes Singulett bei 11,41 ppm (1H) für das mit der Ester-Carbonylgruppe verbrückte Hydroxylproton an C-2 und ein breites Signal bei 8,87 ppm (1H) für das Hydroxylproton an C-4. Beide Signale verschwinden nach Zugabe von D_2O. Ein AB-System mit Zentren bei 6,51 und 6,39 ppm ($J \sim 2,5$ Hz; 2H) entspricht den beiden meta-ständigen Protonen am aromatischen Kern. Bei 1,48 ppm lässt sich ein 3-Protonen-Dublett erkennen mit $J = 6$ Hz, das der Methylgruppe an C-10' zugeordnet wird.

Entkopplungsversuche für die Zuordnung der weiteren Protonen gelangen wegen Ueberlagerungen einzelner Signale nur in einem Fall:

Im Bereich von 5,45 - 6,0 ppm findet man zwei ineinandergeschobene Miltipletts, die nach der Integrationskurve zwei Protonen entsprechen. Wird bei 5,60 ppm eingestrahlt, so verändert sich das Dublett bei 1,48 ppm zu einem Singulett. Auf Grund dieser Tatsache darf das Multiplett, dessen Zentrum bei 5,60 ppm liegt, dem C-10'-Proton zugeordnet werden. Es sei vorweggenommen, dass das benachbarte Multiplett mit Zentrum bei 5,84 ppm dem C-2'-Vinylproton entspricht.

Einen besseren Ueberblick über die Signale der Vinylprotonen, insbesondere des C-8'-Vinylprotons erhält man aus dem NMR.-Spektrum, welches in $(CD_3)_2CO$ aufgenommen wurde (vgl. Fig. 21 und Tab. XIII).

Geringfügig verdeckt durch ein Dublett (C-1'-Vinylproton) bei 6,95 ppm mit J = 16 Hz, lässt sich bei 7,03 ppm eine Signalgruppe erkennen, die aus vier asymmetrischen Dubletts besteht. Aus den 8 Linien lassen sich 3 verschiedene Kopplungskonstanten ablesen, nämlich J = 2 Hz, J = 8 Hz und J = 16 Hz. Daraus geht eindeutig hervor, dass die Signalgruppe dem C-8'-Vinylproton zugeordnet werden darf. Die Kopplungskonstante J = 16 Hz entspricht der trans-Kopplung mit dem C-7'-Vinylproton, das bei 6,12 ppm als Dublett mit J = 16 Hz gefunden wird. Die beiden kleineren Kopplungskonstanten sind auf Kopplungen mit den nicht äquivalenten allylischen Methylenprotonen an C-9' zurückzuführen. Das Erscheinen des C-8'-Vinylprotons bei so tiefem Feld ist gut vereinbar mit seiner β-Stellung zur Carbonylgruppe. Durch die Polarisation des α,β-ungesättigten Carbonylsystems wird die Elektronendichte am β-C-Atom erniedrigt und damit die Abschirmung des β-H-Atoms geschwächt [46].

Wird bei 2,31 ppm, dem ungefähren Bereich für die allylische Methylenprotonen an C-9' und C-3', eingestrahlt, so

wird sowohl das 8-Linien-Signal bei 7,03 ppm (C-8'-Vinylproton) als auch das bereits erwähnte Multiplett bei 5,84 ppm (C-2'-Vinylproton) zu einem Dublett mit J = 16 Hz vereinfacht.

Im Spektrum lassen sich jetzt, in Uebereinstimmung mit den beiden aliphatischen AB-Systemen, vier Dubletts mit J = 16 Hz erkennen.

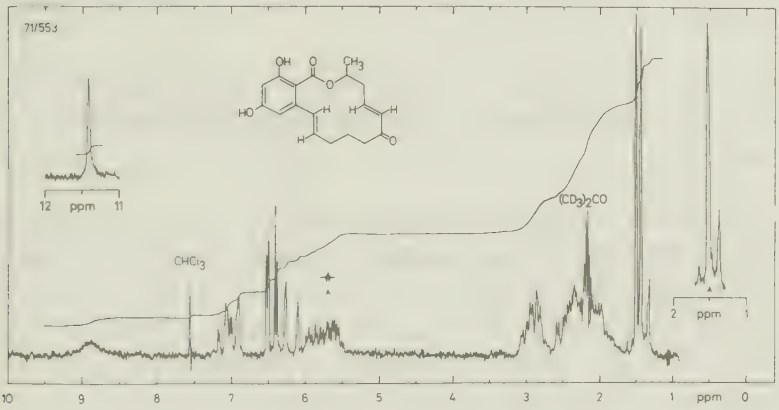


Fig. 20: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 7'-Dehydro-zearalenon (10) in $CDCl_3$-$(CD_3)_2CO$ (1:1) (Einstrahlversuch)

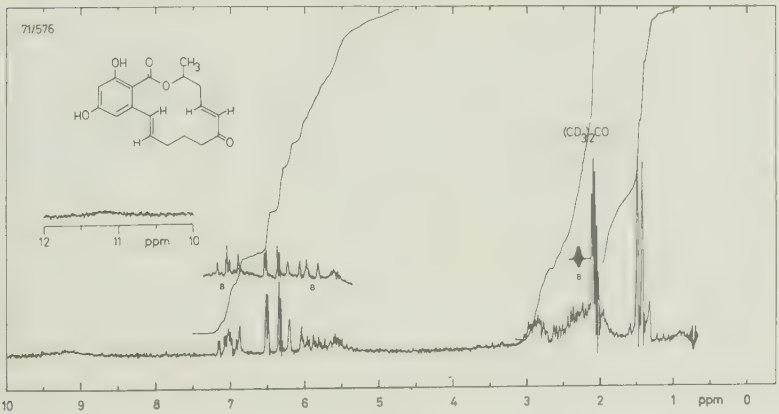


Fig. 21: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 7'-Dehydro-zearalenon (10) in $(CD_3)_2CO$ (Einstrahlversuch)

3.3.3. 8'-Hydroxy-zearalenon (11) und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14)

Die beiden neuen Metabolite aus Gibberella zeae vom Smp. 210 - 212°, $[\alpha]_D^{24}$ = - 149,1° ± 1° (Aceton); resp. Smp. 172 - 174°, $[\alpha]_D^{24}$ = - 53,1° ± 1° (Aceton) sind, wie unten gezeigt wird, epimere 8'-Hydroxyderivate des Zearalenons. Wir bezeichnen sie als 8'-Hydroxy-zearalenon (11) und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14).

Dieser Unterschied wirkt sich für das chromatographische und spektroskopische Verhalten der beiden Verbindungen nur sehr wenig aus.

Die hochauf gelösten Massenspektren(vgl. Tab. XI) der beiden Metabolite sind bis auf geringfügige Intensitätsunterschiede identisch. Für das Molekel-Ion von 11 findet man m/e 334,142483 ± 0,01 und für dasjenige von 14 m/e 334,140652 ± 0,01. Für beide Verbindungen ergibt sich damit die Bruttoformel $C_{18}H_{22}O_6$.

In den Spektren beider Epimeren lässt sich wiederum die mehrfach beschriebene aromatische Bruchstückfolge mit dem "base peak" bei m/e 188 beobachten. Diese Tatsache bestätigt, dass sich die Keto-Gruppe an C-6' befindet und die aliphatische Hydroxylgruppe zwischen C-6' und C-10' lokalisiert sein muss. Das entsprechende aliphatische Bruchstück wird bei m/e 128 erwartet und tatsächlich auch gefunden. Mit wesentlich höherer Intensität erscheint allerdings das durch Wasserabspaltung entstandene Ion mit der Masse 110.

Tabelle XI: Massenspektren von 8'-Hydroxy-zearalenon (11) und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14)

8'-Hydroxy-zearalenon (11)			8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14)		
m/e	Fragment	%	m/e	Fragment	%
334	$C_{18}H_{22}O_6$	50,0	334	$C_{18}H_{22}O_6$	19,5
317	$C_{18}H_{21}O_5$	5,3	317	$C_{18}H_{21}O_5$	4,5
316	$C_{18}H_{20}O_5$	20,8	316	$C_{18}H_{20}O_5$	19,5
189	$C_{11}H_9O_3$	64,3	189	$C_{11}H_9O_3$	34,4
188	$C_{11}H_8O_3$	100,0	188	$C_{11}H_8O_3$	100,0
161	$C_{10}H_9O_2$	56,0	161	$C_{10}H_9O_3$	70,3
160	$C_{10}H_8O_2$	14,6	160	$C_{10}H_8O_2$	17,2
128	$C_7H_{12}O_2$	12,8	128	$C_7H_{12}O_2$	11,2
110	$C_7H_{10}O$	56,5	110	$C_7H_{10}O$	65,8

Die UV.-Spektren von 11 und 14 sind nicht nur unter sich, sondern auch mit dem Spektrum von 1 identisch. Ebenso lassen sich bei Zugabe von $AlCl_3$ resp. NaOH die gleichen, für das chromophore System charakteristischen, Veränderungen wie in 1 erkennen.

Der obere Wellenzahlenbereich der IR.-Spektren von 11 und 14 (vgl. Fig. 22) ist gekennzeichnet durch breite Absorptionen der assoziierten Hydroxylgruppen. Die Banden der Ester- und Keto-Carbonylfunktion erscheinen in 11 bei 1641 cm^{-1} resp. 1694 cm^{-1} und in 14 bei 1644 cm^{-1} resp. 1681 cm^{-1}. Die geringfügig tiefere Lage der Keto-Carbonyl-Streckschwingung im Spek-

trum von 14 ist möglicherweise auf eine schwache Assoziation der 8'-Hydroxygruppe mit der 6'-Ketogruppe zurückzuführen. Die Flexibilität des Lactonrings lässt allerdings für beide möglichen Stellungen der 8'-Hydroxygruppe Konformationen finden, in denen eine schwache Assoziation möglich wäre.

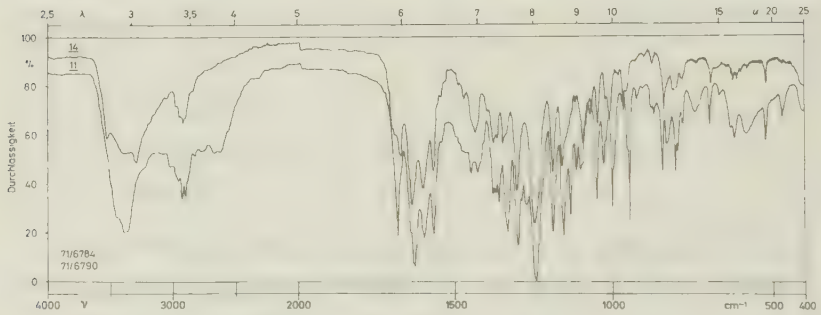


Fig. 22: IR.-Spektren von 8'-Hydroxy-zearalenon (11) und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14) in KBr

Aus den NMR.-Spektren von 11 und 14 in $(CD_3)_2CO$ ist ersichtlich, dass im Vergleich zum Spektrum von Zearalenon (1) zwei neue Signale auftreten, die je einem Proton entsprechen.

Im Spektrum von 11 (vgl. Fig. 23 und Tab. XIII) überlagern sich die beiden Signale und erscheinen zusammen bei 4,14 ppm als Multiplett (2H), das etwa die Form eines Tripletts besitzt. Zugabe von D_2O ändert die Form des Signals nicht, jedoch die Intensität, die jetzt nach der Integrationskurve nur noch einem Proton entspricht. Das mit D_2O austauschbare Proton wird demnach der C-8'-Hydroxygruppe zugeordnet und das nicht ausgetauschte Multiplett dem Methinproton an C-8'.

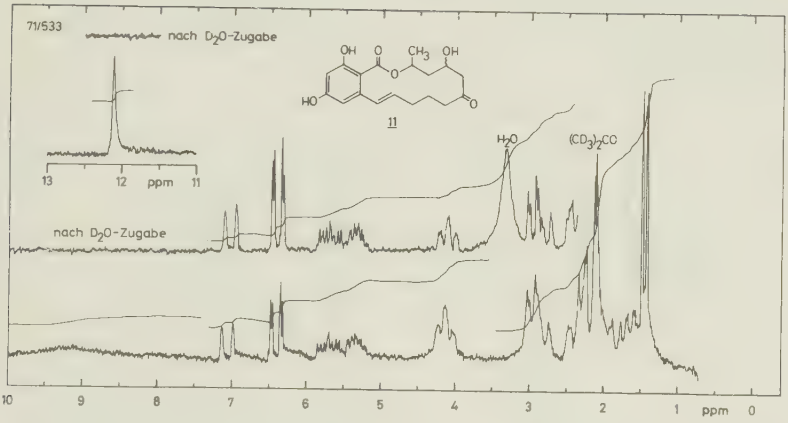


Fig. 23: 100 Mhz - NMR.-Spektrum von 8'-Hydroxy-zearalenon (11) in $(CD_3)_2CO$

Die vorgenommene Zuordnung lässt sich am Dimethyläther 12 von 8'-Hydroxy-zearalenon (11), der durch Umsetzung mit Methyljodid und K_2CO_3 in Aceton hergestellt wurde, bestätigen.

Im NMR.-Spektrum von 12 in $CDCl_3$ (vgl. Fig. 24 und Tab. XIII) erscheinen die beiden Protonen getrennt voneinander; das Methinproton an C-8' bei 4,12 ppm als Multiplett und das C-8'-Hydroxylproton als Dublett bei 3,12 ppm mit J = 4 Hz. Beim Einstrahlen an der Stelle des C-8'-Methinprotons verwandelt sich das Dublett in ein Singulett. Gleichzeitig verändert sich die komplexe Signalgruppe im Bereich von 2,8 - 2,4 ppm (4H, C-7' und C-5'). Wird bei 2,54 ppm eingestrahlt, so bleibt das Signal bei 4,12 ppm ein Multiplett. Wird der Entkopplungsversuch nach D_2O-Zugabe wiederholt, so verwandelt sich das Multiplett bei 4,12 ppm in ein Triplett mit J = 6 Hz, was der Kopplung mit den Methylenprotonen an C-9' entsprechen dürfte.

Weitere Entkopplungsversuche, die Auskunft über die Konfiguration an C-8' geben sollten, waren wegen der zu ähnlichen chemischen Verschiebungen der entsprechenden Protonen nicht erfolgreich.

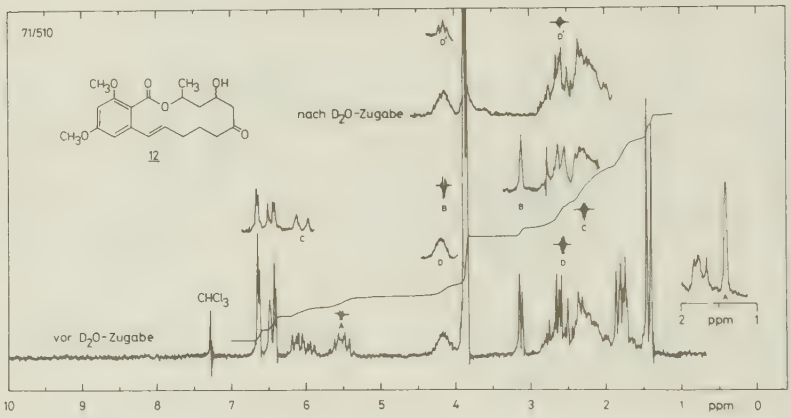


Fig. 24: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxy-zearalenon (12) in $CDCl_3$ (Einstrahlversuche)

Im NMR.-Spektrum von 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14) in $(CD_3)_2CO$ (vgl. Fig. 25 und Tab. XIII) lässt sich bei 4,40 ppm das C-8'-Methinproton als Multiplett erkennen, während das C-8'-Hydroxylproton bei 3,83 ppm als Dublett mit J = 4 Hz zu finden ist. Doppelresonanzversuche bestätigen diese Zuordnung, erlauben aber ebenfalls keine Aussage über die Konfiguration am 8'-C-Atom.

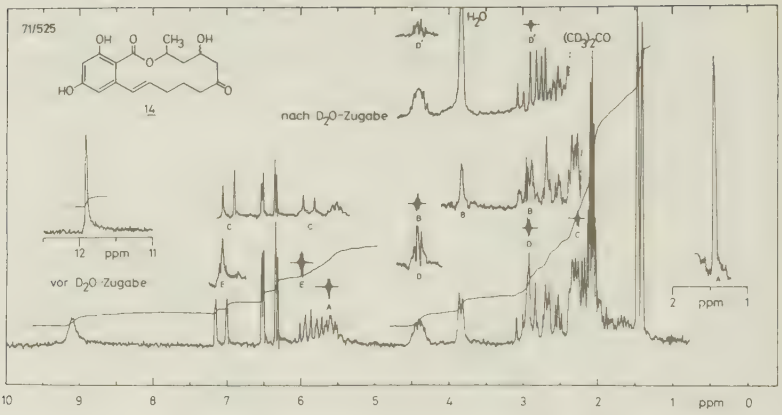


Fig. 25: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14) in $(CD_3)_2CO$ (Einstrahlversuche)

Die Epimerie der Hydroxy-zearalenone 11 und 14 wurden wie folgt bewiesen:

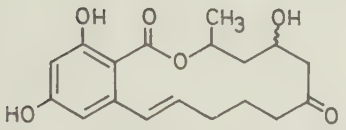
8'-epi-Hydroxy-zearalenon 14 wurde analog zu 11 in den Dimethyläther 15 übergeführt. Die beiden Dimethyläther 12 und 15 ergaben nach Oxidation mit CrO_3-H_2SO_4 in Aceton das gleiche Diketon 13 (2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon (vgl. Formelschema 5 und Fig. 26).

Die Oxidationsprodukte zeigten keinen definierten Schmelzpunkt. Ob sich die Kristalle unter Schmelzbedingungen allgemein zersetzen oder ob nur eine Umwandlung in die beiden möglichen Enolformen 16 resp. 17 erfolgt, konnte nicht festgestellt werden.

Die optischenDrehwerte waren innerhalb der Fehlergrenze gleich, nämlich $[\alpha]_D^{24} = -93{,}2° \pm 1°$ resp. $[\alpha]_D^{24} = -92{,}8° \pm 1°$ (Chloroform).

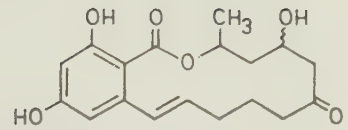
Die hochaufgelösten Massenspektren der aus den beiden Dimethyläthern 12 und 15 stammenden Oxidationsprodukte zeig-

Formelschema 5:



8'-Hydroxy-zearalenon 11

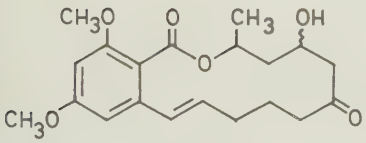
Smp. 210-212°



8'-epi-Hydroxy-zearalenon 14

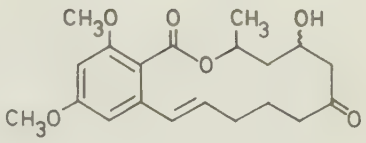
Smp. 172-174°

CH_3J
K_2CO_3
Aceton



12

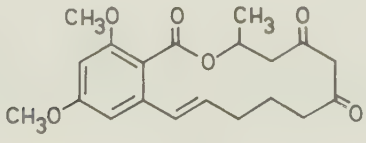
CH_3J
K_2CO_3
Aceton



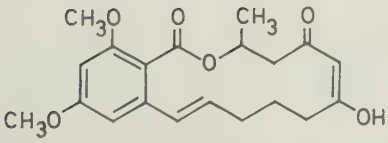
15

$CrO_3 - H_2SO_4$
Aceton
2h (10-15°)

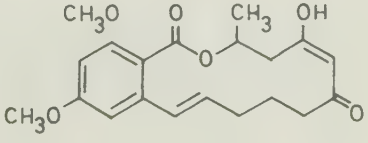
$CrO_3 - H_2SO_4$
Aceton
15 Min. (10-15°)



13



16



17

ten das Molekel-Ion bei m/e 360,161059 ± 0,008 resp. m/e 360,160487 ± 0,008. Daraus ergibt sich die Bruttoformel $C_{20}H_{24}O_6$.

Die IR.-, UV.- und NMR.-Spektren von 13 zeigen, dass die Verbindung eine β-Diketongruppierung enthält, was die 8'-Stellung der Hydroxyle in den beiden Metaboliten bestätigt. Wie bereits erwähnt, ist damit die Ausbildung von zwei Enolformen 16 und 17 möglich. Ueber die Lage des Gleichgewichts zwischen der Ketoform 13 einerseits und den beiden Enolformen 16 und 17 andererseits lassen sich aus denDaten dieser Spektren einige Aussagen machen:

Das IR.-Spektrum von 13 (fest in KBr) (vgl. Fig. 26) lässt bei 1728 cm^{-1} ein intensives Maximum erkennen, das der Carbonylschwingung des Lactons und dem nicht enolisierten Diketon zugeordnet wird. Eine deutliche, für Enole charakteristische freie Hydroxyl-Bande im Bereich von 3500 cm^{-1} oder eine assoziierte OH-Schwingung im Gebiet von 2500 cm^{-1} sind nicht erkennbar [1]. Desgleichen fehlt eine entsprechende freie oder assoziierte Carbonylschwingung, die bei ca. 1650 cm^{-1} resp. 1615 cm^{-1} zu erwarten wäre.

Aromatenbanden sind zu finden bei 1603 und 1575 cm^{-1}. Auf Grund dieser IR.-Daten darf angenommen werden, dass das β-Diketon in festem Zustand ausschliesslich in der Ketoform 13 vorliegt.

Das UV.-Spektrum von 13 (vgl. Tab. XII) zeigt sowohl in Cyclohexan als auch in Äthanol die gleichen Absorptionsmaxima und log ε-Werte.

Das identische Verhalten in einem unpolaren und polaren Lösungsmittel ist ein starker Hinweis dafür, dass das Diketon in Lösung bevorzugt in Enolform vorliegt. Ein Vergleich der

---

1) Das bei 3445 cm^{-1} schwach angedeutete Maximum dürfte durch Spuren von Luftfeuchtigkeit verursacht sein.

Lage der Maxima mit dem Spektrum der Dimethyläther 12 und 15 bestätigt diesen Befund (vgl.Tab. XII).

Das Hauptmaximum erscheint wie im Spektrum von 12 und 15 bei 223 nm, hingegen sind die Schultern bei 255 - 256 nm und die Banden bei 296 - 299 nm nicht vorhanden. Dafür lässt sich eine intensive Absorption bei 260 nm und eine Inflexion bei 290 nm erkennen. Diese Unterschiede zeigen eindeutig, dass die Absorption des aromatischen π-Systems überlagert wird. Dies ist aber nur dann möglich, wenn 13 wenigstens zum Teil enolisiert ist.

In alkalischer Lösung tritt eine neue sehr intensive Bande bei 299 nm auf, die durch die Absorption des Enolat-Ions verursacht wird.

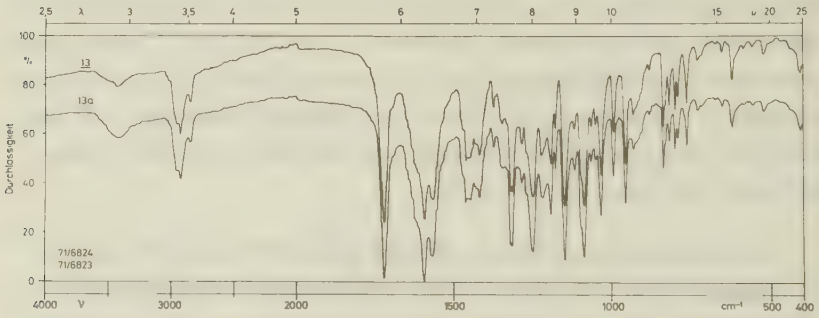


Fig. 26: IR.-Spektrum von 2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon 13 in KBr

Tabelle XII: UV.-Spektren von 12, 13 und 15

	Cyclohexan	"Äthanol	"Äthanol + NaOH
12	---	223 (4,44) 256 (4,10) 299 (3,37)	---
13	223 (4,40) 260 (4,25) 290 (3,84)	223 (4,48) 260 (4,29) 290 (3,86)	223 (4,49) 264 (4,25) 299 (4,26)
14	---	222 (4,43) 255 (4,05) 296 (3,32)	---

Im NMR.-Spektrum von 13 (in $CDCl_3$) (vgl.Tab. XIII) sind die Signale für das 8'-Methin- und 8'-Hydroxy-Proton, wie sie in den Spektren von 12 und 15 zu finden waren, nicht mehr vorhanden. Als neues und für die Struktur charakteristisches Signal findet man bei 5,53 ppm ein scharfes Singulett, das nach der Integrationskurve etwa einem Proton entspricht und mit D_2O sehr langsam austauscht. Wenn wir annehmen, dass 13 ausschliesslich in den Enolformen 16 und 17 vorliegt, so kann dieses Signal dem Vinylproton an C-7' zugeordnet werden, in Analogie zu Diketonen mit ähnlicher chemischer Umgebung, wie etwa 2,4-Pentan-dion [47], 2,4-Hexandion [48] oder Dimedon [49]. Entsprechend sollte das OH-Proton an C-8' resp. C-6' bei sehr tiefemFeld zu finden sein. Es konnte aber weder im Spektrum selber, noch im Bereich von 10 - 20 ppm entdeckt werden. Denkbar wäre, dass die Austauschgeschwindigkeit zufällig etwa in der gleichen Grössenordnung liegt wie die Relaxationszeit und dadurch das Proton als so breites Signal

erscheint, dass es übersehen wurde. Ob in $CDCl_3$-Lösung auch die Ketonform beteiligt ist, liess sich aus diesem NMR.-Spektrum nicht eindeutig entscheiden.

Die Methylenprotonen an C-7' müssten nach Literatur [47] [48] [49] bei etwa 3,5 - 4 ppm als Singulett erscheinen.

Ausser den beiden Singuletts bei 3,86 ppm und 3,82 ppm für die Methoxygruppe an C-2 und C-4, liessen sich im Bereich von 3 - 5 ppm keine weiterenSignale erkennen. Nicht auszuschliessen ist allerdings, dass ein eventuell vorhandenes schwaches Signal für die C-7'-Methylenprotonen durch die Methoxy-Singuletts verdeckt ist.

Um diese Möglichkeit auszuschalten, wurde ein NMR.-Spektrum in C_6D_6 aufgenommen (vgl.Fig. 27 und Tab. XIII). Die Methoxy-Signale sind durch den Einfluss des anisotropen Lösungsmittels Benzol nach höherem Feld verschoben worden. Wir finden sie bei 3,39 und 3,25 ppm wiederum als scharfe 3-Protonen-Singuletts. Damit lässt sich der Bereich um 4 ppm gut überblicken, zeigt aber wiederum kein Signal für C-7'-Methylenprotonen.

Damit in Einklang steht das Erscheinen eines scharfen Singuletts bei 5,36 ppm, das vom Vinyl-Proton an C-7' hervorgerufen wird. Das entsprechende C-8' resp. C-6' Hydroxyl-Proton konnte ebenfalls gefunden werden. Es erscheint als sehr breites, äusserst schwaches Signal bei 16 ppm und lässt sich mit D_2O austauschen.

Mit diesem abschliessenden Versuch konnte spektroskopisch erneut gezeigt werden, dass das Diketon 13 in Lösung ausschliesslich enolisiert ist.

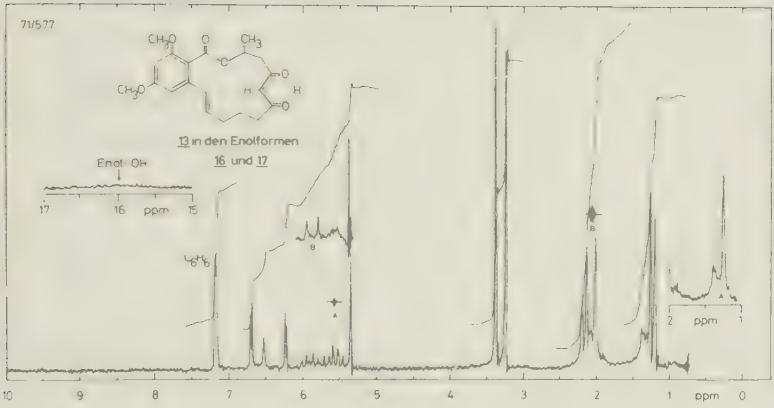


Fig. 27: 100 MHz - NMR.-Spektrum von 2,4-Di-C-methyl-8'-oxo-zearalenon (13)

Tabelle XIII: Zuordnung der H-Atome in den NMR.- Spektren[1] von 10, 11, 12, 13, 14 und 15

Verbindg.	Lösungsmittel	2-OH s	4-OH s	[2] 2-OCH_3 4-OCH_3 s	C-3 ; C-5 AB (2,5)	C-1' d(16)	C-2' m	C-7'	C-8' m	8'-OH	C-10' m	C-11' d (6)
10	$(CD_3)_2CO$	11,14	9,14	-	6,51 6,33	6,95	5,84	6,12 d(16)	7,03	-	5,60	1,48
11	$(CD_3)_2CO$	12,10	9,12	-	6,47 6,33	7,06	5,70	[7] 3,2-2,6	4,14	[3] 4,14	5,34	1,46
12	$CDCl_3$	-	-	3,84 3,82	6,62 6,39	[4] 6,55	6,03	[7] 2,8-2,4	4,12	3,12 d(4)	6,48	1,40
14	$(CD_3)_2CO$	11,90	9,11	-	6,51 6,32	7,08	5,86	[7] 3,2-2,8	4,40	3,84 d(4)	5,60	1,43
15	$CDCl_3$	-	-	3,85 3,82	6,59 6,49	[4] 6,50	6,00	[7] 2,9-2,6	4,26	3,04 d(4)	5,45	1,43
										8'-OH resp. 6'-OH		
13	$CDCl_3$	-	-	3,86 3,82	6,67 6,38	[4] 6,32	[5] 6,18	5,53 s	-	[6] -	5,44	1,47
13	C_6D_6	-	-	3,39 3,25	6,70 6,23	[4] 6,61	5,86	5,36 s	-	16	5,59	1,23

1) δ-Werte in ppm mit $Si(CH_3)(TMS)$ als internem Standard. Bei eindeutig erkennbaren Feinstrukturen bedeuten: s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett. In Klammern sind die Spin-Spin-Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

2) Die Methoxy-Signale können nicht spezifisch dem einen odern andernWert zugeordnet werden.

3) Das Signal dieses Protons wird durch das C-8'-Proton überdeckt.

4) Das Dublett dieses Protons wird teilweise vom AB-System überlagert.

5) Dieses Signal wird teilweise durch andere Signale überdeckt.

6) Dieses Signal müsste vorhanden sein, konnte aber nicht gefunden werden.

7) Diese Signale werden von den C-5'-Methylenprotonen überlagert; die Feinstruktur ist nicht erkennbar.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert (Fehler ± 1°).

Substanzproben für die UV.-, IR.-, NMR.- und Massenspektren, ferner für Mikroanalysen und optische Drehungen wurden mindestens 16 Std. bei 0,01 Torr und 25° getrocknet, sofern nichts anderes angegeben ist.

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium des Instituts für Organische Chemie (E. Thommen) durchgeführt. Die UV.-Spektren wurden mit einem Beckman-UV.-Spektrophotometer, Modell DK 2 und die IR.-Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektrallaboratorium des Instituts für Organische Chemie (K. Aegerter) aufgenommen.

Die 100 MHz-NMR.-Spektren wurden von H. P. Huber im Spektrallaboratorium des Physikalisch-chemischen Instituts der Universität Basel mit einem Varian HA-100 D-Spektrometer gemessen, die 60 MHz-Spektren im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. Aegerter) mit einem Varian A-60-Spektrometer.

Die Aufnahmen der Niederauflösungs-Massenspektren besorgte Herr Dr. C. Pascual im Spektrallaboratorium des Physikalischen Instituts mit einem Hitachi-Perkin-Elmer-Gerät, Modell RMU 7.

Die Hochauflösungs-Massenspektren verdanken wir Herrn Dr. H. Lichti von der Firma Sandoz A.G., Basel. Sie wurden

auf einem CEC-Massenspektrometer 21-110 B vermessen.

Allen erwähnten Herren sei an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Bemühungen herzlich gedankt.

Zur Bestimmung der optischen Drehungen wurde ein Perkin-Elmer-Polarimeter, Modell 141, benützt.

Zur Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode [50] oder nach der Modifikation von Duncan [51] diente "Kieselgel 0,05 - 0,20 mm (70 - 325 mesh ASTM)" der Firma E. Merck A.G., Darmstadt. Für die präparative Schichtchromatographie [52] benutzten wir "Kieselgel PF 254" (E. Merck) und für die Dünnschichtchromatographie "Kieselgel G nach Stahl" [53] (E. Merck) unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator. Zur Sichtbarmachung von Substanzen auf PDC wurden UV-Licht ("UV-ANALYSIS"-Gerät der Firma Hoerner), auf DC UV-Licht, J_2-Dämpfe oder spezifische Sprühreagenzien verwendet.

Im Text verwendete Abkürzungen:

DC = Dünnschichtchromatogramm bzw. -graphie
PDC = Präparatives Schichtchromatogramm bzw. -graphie
SC = Säulenchromatogramm bzw. -graphie

2. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830] und Isolierung von Ergosterol aus dem Mycel

2.1. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830]

Die Züchtung erfolgte in Standkulturen zu je 100 ml Nährlösung [Raulin-Thom-Medium [2)]]. 5 Liter Nährlösung wurden auf

2) Raulin-Thom-Medium:
Pro Liter: 50 g Glucose
400 mg Weinsäure, 250 mg $MgCO_3$
250 mg NH_4NO_3, 400 mg K_2CO_3
400 mg $(NH_4)_2HPO_4$, 200 mg $(NH_4)_2SO_4$
50 mg $FeSO_4$, 50 mg $ZnSO_4$

50 500 ml-Erlenmeyer-Kolben verteilt, im Druckautoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen mit einer Suspension von Gibberella zeae-Sporen angeimpft. Die Inkubationszeit betrug 18 Tage bei 23°.

2.2. Isolierung von Ergosterol (2)

Die Kulturbrühe wurde vom Mycel abfiltriert und die Mycelien dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen. Nach Gefriertrocknen des Mycelkuchens und anschliessendem Zerkleinern im Mörser erhielten wir 46,8 g trockenes Mycel. Die Extraktion des pulverigen Mycels erfolgte im Soxhlet-Apparat mit sechsmal je 1 Liter Benzol während insgesamt 48 Stunden. Die so gewonnenen Mycel-Extrakte wurden vereinigt, filtriert und im Vakuum auf ein Volumen von ca. 500 ml eingeengt. Trocknen über $NaSO_4$ und völligesEinengen am Vakuum bei 60° lieferte 5,2 g eines viskösen, hellgelben Oels, das in 20 ml Benzol gelöst, auf 520 g Kieselgel aufgetragen wurde. Zur Elution diente Benzol mit steigenden Mengen Äther. (Fraktionen à 250 ml).

Die Fraktionen Nr. 41 - 49 (1,5 % Äther) ergaben 240 mg grünlich-weisse Kristalle, die durch zweimaliges Umkristallisieren in abs. Äthanol weiter gereinigt werden konnten. Die Mutterlaugenrückstände wurden erneut an der 100-fachen Menge Kieselgel chromatographiert und die sterolhaltigenFraktionen aus abs. Äthanol kristallisiert.Total resultierten 186 mg reines Ergosterol (2) in farblosen Plättchen vom Smp. 160 - 162° (Lit. [54]: 165°); $[\alpha]_D^{24}$ = - 132° ± 1° (c = 1,000 in $CHCl_3$) (Lit. [54]: - 135°).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3420 cm^{-1} (breit, OH); 2950; 2865; 1453; 1380; 1368; 1068; 1038; 982; 968; 832 und 795 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 262 nm ($\log \varepsilon$ = 3,85); 271 nm (4,00); 281 nm (4,03) und 293 nm (3,78).

60 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: Doppeltes Dublett bei 5,48 ppm (2H an C-6 und C-7), Multiplett bei 5,22 ppm (2H an C-22 und C-23), Multiplett bei 3,62 ppm (1H an C-3), Singulett bei 1,70 ppm* (OH an C-3),Singulett bei 0,97 ppm (3H an C-19) und bei 0,63 ppm (3H an C-18) * = mit D_2O austauschbares Proton.

Massenspektrum (vgl. Fig. 4): Molekel-Ion bei m/e 396 (9,3 %). Weitere "peaks" bei m/e 381 (0,9 %); 378 (1,4 %); 363 (16,3 %); 271 (8,7 %); 253 (16,3 %) und 143 (39,5 %).

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 60° getrocknet.

$C_{28}H_{44}O$ (396,6) Ber. C 84,78 H 11,18 % Gef. C 84,48 H 11,15 %

2.3. 3-O-Acetyl-ergosterol (3)

Eine Lösung von 132 mg Ergosterol (2) (0,33 mMol) in 2 ml abs. Pyridin und 1 ml Acetanhydrid wurde 16 Std. bei 37° im Dunkeln stehengelassen. Fünfmaliges Abdampfen mit Benzol und dreimaliges Abdampfen mit Methylenchlorid im Vakuum ergab 150 mg rot-braunes Rohprodukt, das durch Chromatographie an 15 g Kieselgel mit Benzol gereinigt wurde. Aus den Fraktionen Nr. 5 - 11 resultierten 110 mg Rohkristalle 3 (76 % d. Th.). Umkristallisieren aus Methanol ergab 99 mg (68 % d. Th.) DC-einheitliche Kristalle (Eluens: Benzol-Methanol-(95:5)) vom Smp. 179 - 181° (Lit. [54]: 181°); $[\alpha]_D^{24}$ = - 89° ± 1° (c = 1,000 in $CHCl_3$) (Lit. [54]: -90°).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u. a. Banden bei 2950; 2862; 1725 (C=O); 1453; 1378; 1362; 1255; 1241; 1026; 972; 958; 825 und 793 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Aethanol: Maxima bei 262 nm (log ε = 3,66); 271 nm (3,82); 281 nm (3,84) und 293 nm (3,59).

60 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: Doppeltes Dublett bei 5,48 ppm (2H an C-6 und C-7), Multiplett bei 5,22 ppm (2H an C-22 und

C-23), Multiplett bei 4,70 ppm (1H an C-3), Singulett bei 2,03 ppm (Acetoxy an C-3), Singulett bei 0,98 ppm (3H an C-19) und Singulett bei 0,63 ppm (3H an C-18).

Massenspektrum: u.a. "peaks" bei m/e 396 (6,3 %); 381 (3,5 %); 378 (40,1 %); 363 (6,3 %); 313 (4,5 %); 253 (37,5 %) und 143 (58,1 %).

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 60° getrocknet.

$C_{30}H_{46}O_2$ (438,7) Ber. C 82,13 H 10,57 % Gef. C 81,99 H 10,74

3. Züchtung von Gibberella zeae (Gordon) [Stamm NRRL 2830] auf Mais und Isolierung von Zearalenon und der verwandten Metabolite

3.1. Mikrobieller Hauptansatz

100 ml-Erlenmeyer-Kolben mit je 25 g sterilisiertem, grobkörnigem Mais mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 45 % wurden mit je 0,5 ml einer Gibberella zeae-Sporensuspension angeimpft und 3 Wochen bei 12° inkubiert. Am Ende der Wachstumsperiode wurde das mit Mycel stark durchwachsene Nährmedium durch kräftiges Schütteln wieder aufgelockert und für die Beimpfung der folgenden Grosskulturen bereitgestellt.

7,5 kg grobkörniger Mais wurde in Portionen à 300 g auf 25 1 Liter-Erlenmeyer-Kolben verteilt. Durch Zugabe von je 135 ml entmineralisiertem Wasser unter kräftigem Schütteln konnte eine gleichmässige Befeuchtung der Maiskörner erreicht werden. Die so präparierten Nährmedien wurden im Druckautoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen mit je einer Vermehrungskultur angeimpft. Um eine möglichst gleichmässige Verteilung des Inokulats zu erreichen, wurden die Kolben nochmals kräftig geschüttelt. Die Inkubation erfolgte zuerst eine Woche bei 23°, dann 8 - 10 Wochen bei 12°.

Nach einer Wachstumsperiode von 8 Wochen bei 12° wurden täglich 2 Kulturen geerntet, in 2 l Methylenchlorid aufgeschlemmt und mit einem Mixer vermahlen.

Den erhaltenen Brei nutschte man über ein Nylontuch ab. Der Rückstand wurde in 4 Portionen zu ca. 100 g (bezogen auf das Maistrockengewicht) mit Methylenchlorid im Soxhlet-Apparat extrahiert, wobei 1 Liter-Fraktionen nach 1,2, 4, 8 und 16 Stunden genommen wurden.Total 22 l roter Extrakt wurde durch Hyflo filtriert und im Vakuum auf 1,5 l eingeengt. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 ml destilliertem Wasser, wurde das Konzentrat mit Na_2SO_4 getrocknet und am Vakuum vollständig eingedampft. Mit diesem Verfahren konnten aus den 25 Kulturen insgesamt 104,7 g dunkelroter, halbfester Extrakt erhalten werden.

Eine weitere Vorreinigung konnte erreicht werden, indem man das Konzentrat in 3 l Äther aufnahm, fünfmal mit 500 ml 2$\underline{N}$ $KHCO_3$-Lösung extrahierte und mit destilliertem Wasser wusch, bis die Waschlösung farblos war.

Die nunmehr dunkelgelbe Ätherlösung wurde auf 1 Liter eingeengt und zur Abtrennung der phenolischen Zearalenone siebenmal mit je 500 ml 2$\underline{N}$ Na_2CO_3-Lösung unter Eiskühlung ausgeschüttelt. Die orangegelbe wässerige Phase wurde mit 25-proz. H_2SO_4 unter Zugabe von Eis auf pH 6,0 gestellt und mit 1,5 l Äther ausgezogen. Diesen Vorgang wiederholte man dreimal, wobei der pH-Wert sukzessive auf 5,0 erniedrigt wurde.

In analoger Weise wurde auch die $KHCO_3$-Phase aufgearbeitet.

Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen erhielt man folgende Rohextrakte:

neutraler Ätherextrakt	: 86,8 g orangerotes, z.T.festes Oel
$KHCO_3$-Extrakt	: 0,3 g gelber Lack
Na_2CO_3-Extrakt	: 15,2 g gelber Schaum

3.2. Isolierung von Ergosterol

Der orangerote Ätherextrakt (86,8 g) wurde in 500 ml 90-proz. Äthanol gelöst und mit 300 ml einer 1-proz. alkoholischen Digitoninlösung versetzt. Das Gemisch liess man über Nacht bei 0° stehen, nutschte dann das ausgefallene Digitonid ab und wusch dreimal mit je 50 ml 90-proz. Äthanol nach. Die Spaltung des Komplexes erfolgte nach einer von Issidorides et al. [55] beschriebenen Methode:

Das Digitonid wurde in 100 ml $(CH_3)_2SO$ gelöst und während 15 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach dem Abkühlen extrahierte man das Gemisch fünfmal mit je 150 ml Petroläther. Aus den vereinigten Extrakten resultierten nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Abdampfen des Lösungsmittels 893 mg rohes Sterol. Zweimaliges Umkristallisieren aus abs. Äthanol lieferte 684 mg reines Ergosterol vom Smp. 160 - 163° (Lit. [54]: 165°).

Das Sterol und das daraus hergestellte Acetylderivat waren in jeder Hinsicht identisch mit authentischen Proben.

3.3. Isolierung von Zearalenon und verwandten Metaboliten

Dazu diente der obige Na_2CO_3-Extrakt, der nach folgendem Schema behandelt wurde.

Schematische Darstellung

Säule A

1500 g KG
Benzol mit
0-100% Äther
Fr.à 1000 ml

15,2 g Na_2CO_3-Extrakt gelber Schaum

→ Fr. 21-28 (2-3% Äther) : 103 mg
farbl.Oel
tw.kr.
1,6

→ Fr. 29-40 (3-5% Äther) : 11,65 g
farbl.
Schaum
1

PDC

1.$CHCl_3$/3%EtOH
2.Benzol/4%MeOH

→ Fr. 41-48 (6-8% Äther) : 126 mg
d'gelbes
Oel,tw.kr.
1, 10

→ Fr. 49-70 (10-30% Äther) : 245 mg
br'gelbes
Oel, nicht
aufgeklärt

Säule B

550 g KG
CH_2Cl_2 mit
0-2% MeOH

→ Fr. 71-91 (30-55% Äther) : 568 mg
br'gelbes
Oel, tw.kr.
11, 14

→ Fr. 92-106 (55-80% Äther) : 218 mg
br'roter
Lack, nicht
aufgeklärt

der Auftrennung

Abkürzungen

KG	Kieselgel
Fr.	Fraktionen
PDC	präparative Schichtchromatographie
frakt.Kr.	fraktionierte Kristallisatic
kr.	kristallin
farbl.	farblos
h'gelb	hellgelb
d'gelb	dunkelgelb
br'gelb	braungelb
br'rot	braunrot
tw.	teilweise

→ 68 mg
farbl.
Schaum
6

→ 46 mg
farbl.kr.
10

frakt.Kr.
MeOH-$CHCl_3$

→ Fr. 41-47 (2% MeOH) : 172 mg
h'gelber
Schaum
→ 39 mg
farbl.kr.
11
↓ 129 mg
d'gelber
Schaum
11, 14

PDC
1.$CHCl_3$/4%EtOH
2.Benzol/5%MeOH

→ Fr. 48-75 (2% MeOH) : 314 mg
d'gelber
Schaum
11, 14
→ Zone a: 141 mg
farbl.kr.
14
→ Zone b: 134 mg
farbl.
Schaum
11, 14
→ Zone c: 112 mg
farbl.kr.
11

1 : Zearalenon
6 : 5-Formyl-zearalenon
10 : 7'-Dehydro-zearalenon
11 : 8'-Hydroxy-zearalenon
14 : 8'-epi-Hydroxy-zearalenon

3.4. Zearalenon (1)

(6-(10'-Hydroxy-6'-oxo-trans-1'-undecenyl)-β-resorcylsäure-lacton) (1)

Aus 11,65 g rohem Zearalenon (1) konnten durch zweimaliges Umkristallisieren aus Äther-Pentan-(5:1) 9,84 g farblose Prismen vom Smp. 163 - 164° erhalten werden (Lit. [17]: 161 - 163°; [18]: 164 - 165°; [20c]: 157 - 159°);
$[\alpha]_D^{24}$ = - 134,2 ± 1°; $[\alpha]_{546}^{24}$ = -173,8 ± 1° (Lit. [18]: -170,5°) (c = 1,000 in Methanol)
$[\alpha]_D^{24}$ = -191,8 ± 1°; (Lit. [19]: -190°) (c = 1,000 in Chloroform)

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl.Fig. 6): u.a. Banden bei 3315 (breit, OH); 2930; 1688 (C=O, Keton); 1642 (C=O, Lacton); 1612; 1578 (arom.); 1461; 1437; 1381; 1353; 1314; 1262; 1195; 1168; 1102; 1073; 1016; 968; 848 und 699 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol (vgl.Fig. 5): Maxima bei 236 nm log ε = 4,50); 275 nm (4,16) und 314 nm (3,84).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Fig. 7 und Tab. X)

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl.Fig. 8 und Tab. VIII): Molekel-Ion bei m/e 318,1516 ± 0,01.

Analyse

$C_{18}H_{22}O_5$ (318,1) Ber. C 67,91 H 6,97 % Gef. C 67,87 H 7,18 %

3.4.1. 4-O-Methyl-zearalenon (4)
2,4-Di-O-methyl-zearalenon (5)

Eine Lösung von 1,0 g (3,14 mMol) Zearalenon (1) in 70 ml Aceton wurde mit 11,0 g K_2CO_3 und 19 ml Methyljodid 3 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde in 300 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Es resultierten 1,34 g

hellgelber Lack, der an 150 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol in Fraktionen zu je 100 ml.

Die Fraktionen 30 - 45 ergaben 289 mg 4 (27,7 % d. Th.). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol, das eine Spur Wasser enthielt, resultierten 197 mg (19,0 % d. Th.) farblose Plättchen vom Smp. 120 - 122°. (Lit. [18]: 120-122°; [20c]: 118-120°);

$[\alpha]_D^{24}$ =-176,7 ± 1° (Lit. [20c]: -177°) (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3350 (OH, assoz.); 2942; 1708 (C=O, Keton); 1642 (C=O, Lacton); 1613; 1570 (arom.); 1461; 1441; 1391; 1356; 1318; 1267; 1253; 1218; 1201; 1161; 1137; 1125; 1052; 968 und 828 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 236 nm ($\log \varepsilon$ = 4,48); 273 nm (4,12) und 314 nm (3,84).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ und C_6D_6: vgl. Tab. X)

Massenspektrum (vgl. Tab. VIII): Molekel-Ion bei m/e 332

Zur Analyse wurde 24 Std. bei 45° getrocknet.

$C_{19}H_{24}O_5$ (332,1) Ber. C 68,65 H 7,28 % Gef. C 68,84 H 7,33 %

Die Fraktionen 49 - 67 enthielten 643 mg 5 (60,1 % d.Th.). Zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol ergab 486 mg (44,7 % d. Th.) farblose Nadeln vom Smp. 113 - 114° (Lit. [18]: 112 - 114°; [20c]: 114 - 116°);

$[\alpha]_D^{24}$ = + 49,8 ± 1° (c = 1,000 in Chloroform)

$[\alpha]_D^{24}$ = + 24,7 ± 1° (Lit. [20c]: + 25°(c = 1,000 in Methanol)

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2970; 2948; 2840; 1726 (C=O, Lacton):, 1708 (C=O, Keton); 1598; 1581 (arom.); 1465; 1421; 1358; 1321; 1268; 1201; 1161; 1103; 1084; 1046; 966; 934; 856; 828 und 598 cm^{-1}.

UV.-Spektrum (in Äthanol): Maxima bei 223 nm ($\log \varepsilon$ = 4,48); 256 nm (sh, 4,13) und 298 nm (3,38).

100 MHz - NMR.-Spektrum (in $CDCl_3$ und C_6D_6): (vgl. Tab. X)

Massenspektrum (vgl. Tab. XIII): Molekel-Ion bei m/e 346.

Zur Analyse wurde 24 Std. bei 45° getrocknet.

$C_{20}H_{26}O_5$ (346,1) Ber. C 69,34 H 7,57 % Gef. C 69,11 H 7,55 %

3.5. 5-Formyl-zearalenon (6)

68 mg PDC-gereinigtes 6 wurden einmal aus Methanol umkristallisiert. Es resultierten 53 mg farblose Plättchen vom Smp. 188 - 190°.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 42,0 ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3427 - 2727 (OH, assoz.); 2960 (CH und CH_2); 1701 (C=O, Keton); 1666; 1631 (C=O, Lacton und Aldehyd); 1613; 1569 (arom.); 1463; 1431; 1392; 1365; 1278; 1251; 1208; 1181; 1131; 1120; 1013; 986; 934; 851; 820; 744; 666 und 566 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol (vgl. Fig. 9): Maxima bei 217 nm (log ε = 4,15); 254 nm (4,49); 282 nm (sh, 4,00) und 315 nm (3,72).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl.Fig. 10 und Tab. X).

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. IX): Molekel-Ion bei m/e 346,1427 ± 0,01.

Analyse:

$C_{19}H_{22}O_6$ (346,1) Ber. C 65,88 H 6,40 % Gef. C 65,61 H 6,33 %

3.5.1. Synthese von 5-Formyl-zearalenon (6) und 3-Formyl-zearalenon (7)

Methode a: 5,1 g (0,016 Mol) Zearalenon (1) und 5,2 g (0,130 Mol) NaOH wurden in 30 ml destilliertem Wasser gelöst und in einem mit Rückflusskühler versehenen Sulfierkolben unter N_2-Strom und Rühren portionenweise mit 12 ml Chloroform versetzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf Siedetemperatur

gebracht und während 4 Std. unter Rückfluss gekocht.

Nach Ansäuren (pH5) des dunkelbraunen Reaktionsprodukts mit 2$\underline{\underline{N}}$ H_2SO_4-Lösung, extrahierte man dreimal mit 100 ml Äther.

Die Ätherphase wurde mit 2$\underline{\underline{N}}$ $KHCO_3$-Lösung neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man 7,2 g eines dunkelbraunen Oels, welches an 100 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol mit steigenden Mengen Äther in Fraktionen zu je 100 ml.

Die Fraktionen 8 - 11 (eluiert mit Benzol-Äther-(98:2)) ergaben 31 mg verunreinigtes 5-Formyl-zearalenon (6). Die Verunreinigung war nach DC identisch mit 3-Formyl-zearalenon (7).

Die Fraktionen 12 - 24 (eluiert mit Benzol-Äther-(98:2)) ergaben 268 mg 6 (5,15 % d. Th.). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol resultierten 183 mg (3,27 % d. Th.) farblose Plättchen vom Smp. 189 - 190°. Das so gewonnene synthetische Präparat war in jeder Hinsicht identisch mit dem natürlichen 5-Formyl-zearalenon (6).

Aus den Fraktionen 25 - 42 (eluiert mit Benzol-Äther-(97:3 bis 95:5)) konnten 1,42 g Ausgangsmaterial 1 zurückgewonnen werden.

Methode b: Zu einer gut gerührten, eisgekühlten Suspension von 1 g (3,14 mMol) Zearalenon (1) und 740 mg (6,30 mMol) wasserfreiem Zinkcyanid in 50 ml abs. Äther gab man 840 mg (6,30 mMol) wasserfreies Aluminiumchlorid in 20 ml abs. Äther. In das hellgelbe Gemisch wurde bei 0° während 5 Std. trockenes HCl-Gas eingeleitet, wobei das Zinkcyanid langsam in Lösung ging und sich eine halbfeste Masse abschied. Das Reaktionsgemisch liess man 16 Std. bei 0° stehen, dekantierte dann den Äther ab und hydrolysierte den Rückstand, indem man erst vorsichtig 100 ml eines Eis-Wasser-Gemisches zugab und anschlies-

send 20 Min. auf 80° erwärmte.

Das hydrolysierte Produkt wurde unter Verwendung der abdekantierten Ätherphase dreimal mit je 200 ml Äther ausgeschüttelt und mit 2N $KHCO_3$-Lösung und Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Es resultierten 1,14 g hellgelber Lack, der an 200 g Kieselgel chromatographiert wurde. Eluiert wurde mit Benzol-Äther-(99:1) in Fraktionen zu je 100 ml.

Die Fraktionen 22 - 41 enthielten 654 mg (60,0 % d. Th.) 3-Formyl-zearalenon (7). Zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol lieferte 526 mg (48,4 % d. Th.) farblose Nadeln vom Smp. 171 - 172°.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 130,2 ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3377 - 2600 (OH, assoz.); 2927 (CH und CH_2); 1693 (C=O, Keton); 1626 (breit; C=O, Lacton, Aldehyd, arom.); 1551 (arom.); 1450; 1428; 1408; 1354; 1348; 1308; 1254; 1213; 1204; 1184; 1123; 1058; 1004; 988; 973; 922; 853; 800; 752; 623 und 532 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol (vgl. Fig. 11): Maxima bei 250 nm (log ε = 4,46); 302 nm (4,37) und 350 nm (3,79).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Fig. 12 und Tab. X)

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. IX): Molekel-Ion bei m/e 346,141345 ± 0,008.

Analyse:

$C_{19}H_{22}O_6$ (346,1) Ber. C 65,88 H 6,40 % Gef. C 65,92 H 6,36 %

Die Fraktionen 45 - 59 ergaben 311 mg (28,6 % d.Th.) 5-Formyl-zearalenon (6). Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol konnten 248 mg (22,8 % d.Th) farblose Plättchen vom Smp. 189 - 190° erhalten werden, die in jeder Hinsicht mit dem natürlichen Präparat identisch waren.

3.5.1.1. 2,4-Di-O-methyl-5-formyl-zearalenon (8)

Eine Lösung von 230 mg (0,665 mMol) 5-Formyl-zearalenon (6) in 25 ml Aceton wurde mit 2,3 g K_2CO_3 und 4 ml Methyljodid während 4,5 Std. unter Rückfluss erwärmt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abgenutscht und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Das Rohprodukt wurde in 75 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Man erhielt 273 mg gelben Lack, der schichtchromatographisch gereinigt wurde. (Kieselgel, Fliessmittel: Benzol-Methanol-(95:5)). Aus den Zonen mit dem Rf-Wert 0,5 eluierte man 198 mg 8 (79,5 % d. Th.) als farblosen Lack. Das Produkt war DC-einheitlich (Fliessmittel: Benzol-Methanol-(96:4)). Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, das 2,4-Di-O-methyl-5-formyl-zearalenon (8) in kristalliner Form zu erhalten. Durch Verreiben in Pentan und anschliessender Zugabe von Äther konnte wenigstens amorphes 8 vom Smp. 111 - 112° gewonnen werden.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 52,7° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2930; 1724 (C=O, Lacton); 1705; 1688 (C=O, Keton, Aldehyd); 1671; 1574 (arom.); 1470; 1433; 1381; 1318; 1270; 1211; 1164; 1129; 1090; 988; 965 und 838 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 244 nm (log ε = 4,38); 278 nm (4,01) und 316 nm (3,85).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ und C_6D_6: (vgl. Fig. 13 und 14 und Tab. X).

Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 374 (25,3 %). Weitere "peaks" bei m/e 356 (5,3 %); 245 (37,2 %); 235 ("base peak"); 217 (42,5 %); 207 (11,5 %); 189 (42,5 %) und 112 (15,4 %).

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

$C_{21}H_{26}O_6$ (374,1) Ber. C 67,36 H 7,00 % Gef. C 67,29 H 6,76 %

3.5.1.2. 2,4-Di-O-methyl-3-formyl-zearalenon (9).

Eine Lösung von 268 mg (0,774 mMol) 3-Formyl-zearalenon (7) in 30 ml Aceton wurde mit 2,7 g K_2CO_3 und 4,7 ml Methyljodid versetzt und während 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Afuarbeiten wie in 3.5.1.1. beschrieben, resultierten 316 mg gelber Lack, der mittels PDC gereinigt wurde (Kieselgel, Fliessmittel: Benzol-Methanol-(95:5)).

Die Zonen mit dem Rf-Wert 0,5 ergaben 248 mg 9 (82,7 % d. Th.) als farblosen Lack. Das Produkt war DC-einheitlich (Fliessmittel: Benzol-Methanol-(96:4)), konnte aber trotz zahlreicher Versuche nicht kristallisiert werden. Durch Verreiben mit Pentan und anschliessender Zugabe von Äther konnte der Dimethyläther 9 wenigstens in amorpher Form (Smp. 113 - 115°) erhalten werden.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 75,2° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 2940; 1706 (C=O, Lacton, Keton); 1686 (C=O, Aldehyd); 1589; 1546 (arom.); 1459; 1394; 1344; 1284; 1214; 1163; 1107; 1083; 978; 930; 856; 649 und 584 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 218 nm (log ε = 4,36); 292 nm (4,35) und 332 nm (sh, 3,73).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ und C_6D_6: (vgl. Fig. 15 und 16 und Tab. X).

Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 374 (9,9 %). Weitere "peaks" bei m/e 356 (5,3 %); 245 ("base peak"); 235 (12,2 %); 217 (21,8 %); 207 (4,0 %); 189 (24,4 %) und 112 (49,3 %).

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

$C_{21}H_{26}O_6$ (374,1) Ber.C 67,36 H 7,00 % Gef. C 67,58 H 7,13 %

3.6. 7'-Dehydro-zearalenon (10)

46 mg PCD-gereinigtes 10 ergab nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther-(1:5) 34 mg farblose Nadeln vom Smp. 197 - 200°.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 133,8° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 18): u.a. Banden bei 3360 (breit, OH); 2927; 1654 (C=O, Lacton; α,β-unges. Keton); 1618; 1578 (arom.); 1454; 1438; 1354; 1342; 1314; 1259; 1191; 1166; 1113; 1069; 974; 959; 846; 834 und 696 cm^{-1}

UV.-Spektrum in Äthanol (vgl. Fig. 17: Maxima bei 229 nm (log ε = 4,45); 274 nm (3,97) und 313 nm (3,66).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$-$(CD_3)_2CO$ (1:1) und $(CD_3)_2CO$: (vgl. Fig. 20 und 21 und Tab. XIII).

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Fig. 19): Molekel-Ion bei m/e 316,135076 ± 0,01 ($C_{18}H_{20}O_5$).

3.7. 8'-Hydroxy-zearalenon (11)

Aus 112 mg schichtchromatographisch gereinigtem 11 konnten durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol-Chloroform-(1:6) 77 mg farblose Kristalle vom Smp. 210 - 212° erhalten werden.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 149,1° ± 1° (c = 1,000 in Aceton).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 22): u.a. Banden bei 3417 (breit, OH); 2950; 2920;,1694 (C=O, Keton); 1641 (C=O, Lacton); 1611; 1580 (arom.); 1461; 1440; 1371; 1344; 1311; 1256; 1203; 1169; 1147; 1066; 1013; 959; 858; 820 und 709 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 236 nm (log ε = 4,43); 274 nm (4,10) und 314 nm (3,78).

UV.-Spektrum in Äthanol-$AlCl_3$: Maxima bei 236 nm; 284 nm und 324 nm.

UV.-Spektrum in Äthanol-NaOH: Maxima bei 236 (sh); 254 nm und 314 nm.

100 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2CO$: (vgl.Fig. 23 und Tab. XIII).

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. XI): Molekel-Ion bei m/e 334, 142483 ± 0,01.

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

$C_{18}H_{22}O_6$ (334,1) Ber.C 64,65 H 6,63 % Gef. C 64,48 H 6,42 %

3.7.1. 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxy-zearalenon (12)

Eine Lösung von 102 mg 11 (0,305 mMol) in 10 ml Aceton wurde mit 1,1 g K_2CO_3 und 1,9 ml Methyljodid während 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurden die anorganischen Salze abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft.

Der hellgelbe, amorphe Rückstand wurde in 40 ml Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Man erhielt 116 mg Rohprodukt als hellgelben Lack, das schichtchromatographisch gereinigt wurde. (Kieselgel: Fliessmittel: Benzol-Methanol-(96:4)). Es resultierten nach Umkristallisieren aus Benzol-Äther-(1:5) 78 mg (70,5 % d.Th.) farblose Kristalle vom Smp. 162 - 164°.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 11,3° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3500; 3460 (breit, OH); 2970; 2955; 2930; 1717 (C=O, Lacton); 1691 (C=O, Keton); 1590; 1568 (arom.); 1450; 1412; 1333; 1315; 1280; 1247; 1192; 1147; 1087; 1037; 964; 957; 921; 827 und 820 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 223 nm (log ε = 4,44); 256 nm (sh, 4,11); 299 (3,37).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Fig. 24 und Tab. XIII).

Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 362.

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 50° getrocknet.

$C_{20}H_{26}O_6$ (362,1) Ber. C 66,28 H 7,23 % Gef. C 66,52 H 7,21 %

3.7.2. 2,4-Di-O-methyl-8'-hydroxy-zearalenon (12)
2,4-Di-O-methyl-8'-epi-hydroxy-zearalenon (15)

134 mg eines Gemisches von rund 60 % 11 und 40 % 14 wurden, wie in 3.7.1. beschrieben, methyliert.

Die Auftrennung der 152 mg Rohprodukt gelang mit PCD (Kieselgel, Fliessmittel: 1. $CHCl_3$-Äthanol-(97:3) und 2. Benzol-Methanol-(96:4)) . Aus der Zone mit dem Rf-Wert 0,7 eluierte man 45 mg 12, aus derjenigen mit dem Rf-Wert 0,6 21 mg 15 (Daten siehe 3.8.1.).

3.7.3. CrO_3-Oxidation von 12:
2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon (13)

Eine Lösung von 100 mg 12 (0,276 mMol) in 2 ml über $KMnO_4$ dest. Aceton wurde unter Rühren bei 10 - 15° tropfenweise mit CrO_3-Oxidationslösung versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert. Nach 2 Std. wurde mit wenig Methanol versetzt, die Lösung mit 20 ml H_2O verdünnt, das Aceton im Vakuum entfernt und die wässerige Lösung dreimal mit je 30 ml Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase mit Wasser neutral gewaschen, über Watte filtriert und eingedampft. 103 mg rotbraunes Rohprodukt wurde schichtchromatographisch getrennt. (Kieselgel, Fliessmittel: Benzol-Methanol-(97:3)).

Die Zone mit dem Rf-Wert 0,6 lieferte 25 mg 13 (25,1 % d. Th.) als farblosen Lack, der beim Stehenlassen teilweise kristallisierte. Aus der Zone mit dem Rf-Wert 0,35 konnten 50 mg Ausgangsmaterial eluiert werden, das erneut für die CrO_3-Oxidation eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnten ins-

gesamt 42 mg DC-reines 13 erhalten werden. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol resultierten 27 mg farblose Plättchen vom Smp. 135 - 144°.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 93,2 ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 26): u.a. Banden bei 2927; 1728 (C=O; Lacton und Diketon); 1603; 1575 (arom.); 1471; 1427; 1328; 1321; 1260; 1201; 1155; 1097; 1042; 1003; 968; 848; 812; 776 und 630 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 223 nm (log ε = 4,48); 260 nm (4,29) und 290 nm (infl. 3,86).

UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 223 nm (log ε = 4,40); 260 nm (4,25) und 290 nm (infl. 3,84).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Tab. XIII).

Massenspektrum (hochaufgelöst): Molekel-Ion bei m/e 360,161059 ± 0,008 ($C_{20}H_{24}O_6$).

3.8. 8'-epi-hydroxy-zearalenon (14)

141 mg PCD-gereinigtes 14 ergab nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol-Chloroform-(1:7) 108 mg farblose Kristalle vom Smp. 172 - 174°.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 53,1° ± 1° (c = 1,000 in Aceton).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 22): u.a. Banden bei 3532 - 3316 (breit, OH); 2927; 1681 (C=O, Keton); 1644 (C=O, Lacton); 1611; 1579 (arom.); 1444; 1387; 1356; 1311; 1256; 1200; 1169; 1106; 1059; 1022; 977 und 849 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 237 nm (log ε = 4,45); 276 nm (4,10) und 315 nm (3,74).

UV.-Spektrum in Äthanol-$AlCl_3$: Maxima bei 237 nm; 288 nm und 328 nm.

UV.-Spektrum in Äthanol-NaOH: Maxima bei 237 nm (sh); 249 nm und 315 nm.

100 MHz - NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2CO$: (vgl. Fig. 25 und Tab. XIII).

Massenspektrum (hochaufgelöst) (vgl. Tab. XI): Molekel-Ion bei m/e 334,140652 ± 0,01 ($C_{18}H_{22}O_6$).

3.8.1. 2,4-Di-O-methyl-8'-epi-hydroxy-zearalenon (15)

118 mg 14 (90 mg krist. 14 und 28 mg Mutterlauge aus Versuch 3.8.) wurden unter den gleichen Bedingungen methyliert, wie in 3.7.1. beschrieben. Nach Trennung des Rohprodukts (134 mg) mittels PCD und Umkristallisieren aus Benzol-Äther-(1:5) resultierten 88 mg farblose Kristalle vom Smp. 128 - 130°.

$[\alpha]_D^{24}$ = + 80,4° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr): u.a. Banden bei 3435 (OH); 2927; 1720 (C=O, Lacton); 1708 (C=O, Keton); 1595; 1577 (arom.); 1451; 1422; 1358; 1335; 1320; 1254; 1202; 1154; 1087; 1042; 968 und 838 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 222 nm (log ε = 4,43); 255 nm (sh, 4,60) und 296 nm (3,32).

100 MHz - NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Tab. XIII).

Massenspektrum: Molekel-Ion bei m/e 362.

Zur Analyse wurde 16 Std. bei 40° getrocknet.

$C_{20}H_{26}O_6$ (362,1) Ber. C 66,28 H 7,23 % Gef. C 65,71 H 7,25 %

3.8.2. CrO_3-Oxidation von 15

2,4-Di-O-methyl-8'-oxo-zearalenon (13)

Die Oxidation und Aufarbeitung erfolgte analog zu der in 3.7.3. beschriebenen . Eingesetzt wurden 101 mg 15 (80 mg reines 15 und 21 mg Mutterlauge aus Versuch 3.8.1.). Da die Reaktion wesentlich rascher verlief, wurde nach 15. Min. mit wenig Methanol versetzt. Die Aufarbeitung lieferte 39 mg farblosen Lack, der nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol

24 mg DC-reines 13 vom Smp. 134 - 144° lieferte.

$[\alpha]_D^{24}$ = - 92,8° ± 1° (c = 1,000 in Chloroform).

IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 26): u.a. Banden bei 2927; 1728 (C=O, Lacton und Diketon); 1603; 1575 (arom.); 1471; 1427; 1328; 1321; 1256; 1201; 1155; 1097; 1042; 1003; 967; 848; 814; 776 und 630 cm^{-1}.

UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 223 nm (log ε = 4,46); 259 nm (4,28) und 289 nm (infl. 3,88).

UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 223 nm (log ε = 4,50); 260 nm (4,30) und 289 nm (infl. 3,88).

100 MHz-NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: (vgl. Tab.XIII).

Massenspektrum (hochaufgelöst): Molekel-Ion bei m/e 360,160487 ± 0,008 ($C_{20}H_{24}O_6$).

C. ZUSAMMENFASSUNG

Zearalenon (1) wurde 1962 aus Kulturen von Gibberella zeae [Fusarium graminearum] isoliert. Seine Struktur ist seit 1966 bekannt, seine absolute Konfiguration seit 1967.

Versuche, Gibberella zeae unter Laboratoriumsbedingungen zu züchten und ein Nährmedium zu finden, das sich zur Abklärung der Biogenese von Zearalenon eignet, sind im ersten Teil der vorliegenden Dissertation beschrieben und auf Seite 26 zusammengefasst.

Im zweiten Teil wird über die Isolierung und Strukturaufklärung von vier neuen, mit Zearalenon eng verwandten Metaboliten berichtet. Die Strukturbestimmung stützt sich in erster Linie auf den Vergleich der spektralen Eigenschaften von Zearalenon, $C_{18}H_{22}O_5$, und seine Derivate, dem 4-Monomethyläther (4) und dem 2,4-Dimethyläther (5):

5-Formyl-zearalenon (6), $C_{19}H_{22}O_6$, unterscheidet sich von 1 nur durch die Formylgruppe an C-5, wobei sich die 5-Stellung auf Grund der spektralen Daten von 6 nicht eindeutig ableiten lässt.

Zur Sicherstellung der Struktur von 6 wurden, ausgehend von Zearalenon, nach den Methoden von Reimer-Tiemann und Gattermann-Adams die beiden isomeren Formylderivate hergestellt, nämlich 3-Formyl-zearalenon (7) und 5-Formyl-zearalenon (6), das mit dem natürlichen Derivat identisch war. Die beiden daraus hergestellten Dimethyläther 8 und 9 zeigten im 100 MHz-NMR.-Spektrum, beim Wechsel von $CDCl_3$ nach C_6D_6 als Lösungsmittel, signifikante Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Methoxysignale, auf Grund derer die Stellung der Formylgruppe eindeutig bestimmt werden konnte.

7'-Dehydro-zearalenon (10), $C_{18}H_{20}O_5$, unterscheidet sich von Zearalenon durch eine zusätzliche Doppelbindung am Lactonring. Die 7'-Stellung geht aus dem hochaufgelösten Massenspektrum und Spin-Spin-Entkopplungsversuchen im 100 MHz - NMR.-Spektrum hervor. Die Doppelbindung besitzt trans-Geometrie.

8'-Hydroxy-zearalenon (11), $C_{18}H_{22}O_6$, und 8'-epi-Hydroxy-zearalenon (14), $C_{18}H_{22}O_6$, sind epimere Hydroxyderivate von Zearalenon.

Methylierung der beiden Stoffwechselprodukte ergab die Dimethyläther 12 resp. 15, die durch CrO_3-Oxidation in das identische Diketon 13 übergeführt wurden.

Aus dem IR.-Spektrum von 13 (fest in KBr) geht hervor, dass 13 in festem Zustand bevorzugt in der Ketoform vorliegt, während in Lösung, wie das UV.- und NMR.-Spektrum von 13 zeigen, ausschliesslich die beiden Enolformen 16 resp. 17 vorhanden sind.

Die spektralen Daten der beiden Metaboliten erlauben keine Schlüsse über die Konfiguration der 8'-Hydroxygruppe.

D. LITERATUR-VERZEICHNIS

[1] F. W. Tanner, A.R. English, T. M. Lees und J. B. Routien, Antibiotics and Chemotherapy 2, 441 (1952); H. Grisebach, W. Hofheinz, J. Roy. Inst. Chem. 88, 332 (1964).

[2] J. M. McGuire,R. L. Bunch, R. C. Anderson, H. E. Buaz, E. H. Flynn, H. M. Powell und J. W. Smith, Antibiotics and Chemotherapy 2, 281 (1952). D. R. Haerris, S.G. McGeachin, H. H. Mills, Tetrahedron Letters 1965, 679.

[3] Vgl.J. W. Corcoran in "Biogenesis of Antibiotic Substances", Ed. Z. Vanek und Z. Hostalek, Academic Press, New York, 1965.

[4] Vgl. J. D. Bu'Lock, "The Biosynthesis of Natural Products", McGraw-Hill, London, 1965.

[5] E. Haerri, W. Loeffler, H.P. Sigg, H. Stähelin und Ch. Tamm, Helv. 46, 1235 (1963).

[6] H.P. Sigg, Helv. 47, 1401 (1964).

[7] U. Handschin und Ch. Tamm, Helv. 51, 1943 (1968).

[8] A. J. Birch, O. C. Musgrave, R. W. Rickards und H. Smith, J. Chem. Soc. 1959, 3146.

[9] R. N. Mirrington, E. Ritchie, C. W. Shoppee, W. C. Taylor und S. Sternhell, Tetrahedron Letters 1964, 365.

[10] F. McCapra und A. J. Scott, Tetrahedron Letters 1964, 869.

[11] L. Ettlinger, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein,F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser und H. Zähner, Ber. deutsch. chem. Ges. 92, 1867 (1959).

[12] S. M. Friedmann,T. Kaneda, J. W. Corcoran, J. Biol. Chem. 239, 2386 (1964).

[13] R. B. Woodward, L. S. Weiler, P. C. Dutta, J. Amer. Chem. Soc. 87, 4662 (1965).

[14] D. Shrinivasan, P. R. Shrinivasan, Biochemistry 6, 3111 (1967).

[15] W. Rothweiler und Ch. Tamm, Exp. 22, 750 (1966); Helv. 53, 696 (1970).

[16] M. Binder, J. R. Kiechel und Ch. Tamm, Helv. 53, 1797 (1970).

[17] M. Stob, R. S. Baldwin, J. Tuite, F. N. Andrews and K. G. Gillette, Nature 196, 1318 (1962).

[18] W. H. Urry, H. L. Wehrmeister, E. B. Hodge und P. H. Hidy, Tetrahedron Letters 1966, 3109.

[19] C. H. Kuo, D. Taub, R. D. Hoffsommer und N. L. Wendler, W. H. Urry und G. Mullenbach, Chem. Comm. 1967, 761.

[20] a) D. Taub, N. N. Girotra, R. D. Hoffsommer, C. H. Kuo, H. L. Slates, S. Weber und N. L. Wendler, Chem. Comm. 1967, 225.

b) N. N. Girotra und N. L. Wendler, Chem. and Ind. 1967, 1493.

c) D. Taub, N. N. Girotra, R. D. Hoffsommer, C. H. Kuo, H. L. Slates, S. Weber und N. L. Wendler, Tetrahedron 24, 2443 (1968).

d) H. L. Wehrmeister und D. E. Robertson, J. Org. Chem. 33, 4173 (1968).

e) N. N. Girotra und N. L. Wendler, J. Org. Chem. 34 3192 (1969).

f) J. Vlattas, J. T. Harrison, L. Tokes, J. M. Fried und A. D. Cross, J. Org. Chem. 33, 4176 (1968).

[21] D. B. R. Johnston, C. A. Sawicki, T. B. Windholz und A. A. Patchett, J. Med. Chem. 13, 941 (1970).

[22] G. C. Ainsworth, "Dictionary of the Fungi", Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1967.

[23] K. B. Raper & D. J. Fennel "The Genus Aspergillus", Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1965, pg. 37 - 38.

[24] J. V. Fiore, Arch. Biochem. Biophys. 16, 161 (1948).

[25] H. Brockman, F. Pohl, K. Maier und M. N. Haschad, Liebigs Ann. Chem. 553, 32 (1942).

[26] E. A. H. Friedheim, Helv. 21, 1464 (1938).

[27] C. J. Mirocha, C. M. Christensen, and G. H. Nelson, Appl. Microbiol. 15, 497 (1967).

[28] J. N. Ashley, B. C. Hobbs and H. Raistrick, Biochem. J. 31, 385 (1937).

[29] H. Tanaka and T. Tamura, Tetrahedron Letters 1961, 151.

[30] G. H. Stout, D. L. Dreyer and L. H. Jensen, Chem. and Ind. 1961, 289.

[31] S. Shibata, E. Morishita, T. Takeda and K. Sabata, Tetrahedron Letters 1966, 4855.

[32] C. Liebermann, Ber. deutsch. chem. Ges. 18, 1803 (1885).

[33] C. H. Brieskorn and H. Hofmann, Arch. Pharm. 297, 577 (1964).

[34] L. Dorfmann, "Ultraviolet Absorption of Steroids", Chem. Reviews 53, 47 (1953).

[35] J. Jacques, H. Kagan und G. Ourisson: "Tables de Constantes et Données Numériques": Pouvoir rotatoire naturel I. Steroids, Paris 1965.

[36] M. Spiteller und G. Spiteller, "Massenspektren von Steroiden", Fortschritte der chem. Forschung 1969, pg 269.

[37] S. S. Friedland und G. H. Lane, Anal. Chemistry, 31, 169 (1959).

[38] H. Budzikiewicz, D. Djerassi, D. H. Williams, "Mass Spectroscopy of Org. Comp.", Holden-Day, Inc. 1967 a) pg 200 b) pg 176 c) pg 219 d) pg 141.

[39] R. G. Wilson, J. H. Bowie, D. H. Williams, Tetrahedron 24, 1407 (1968).

[40] A. J. Scott, "Interpretation of Ultraviolet Spectra of Natural Products", Pergamon Press, Oxford 1964, a) pg 114 b) pg 58.

[41] F.Tiemann und E. Helkenberg, Ber. deutsch.chem. Ges. 12, 999 (1879).

[42] J. Renz, Helv. 30, 124 (1947).

[43] R. C. Shah, M. C. Laiwalla: J. Chem. Soc. 1928 (1938).

[44] W. B. Walley, J. Chem. Soc. 3278 (1949).

[45] R. T. Seshadri and G. B. Venkatasubramamian, J. Chem. Soc. 1658 (1959).

[46] D. H. Villiams and J. F. Fleming, "Spektroskop. Methoden in der Org. Chemie", G.Thieme-Verlag, Stuttgart 1968, pg 103.

[47] H. Suhr "Anwendung der Kernmagnetischen Resonanz in der OrganischenChemie", Springer-Verlag, Berlin, 1965 pg 300.

[48] J. L. Burdett and M. T. Rogers, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2105 (1964).

[49] vgl. Varian-Katalog, Spectrum No. 512.

[50] T. Reichstein und C. W. Shoppee, Discuss. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).

[51] G. R. Duncan, J. Chromatography, 8, 37 (1962).

[52] F. J. Ritter und G. Meyer, Nature 193, 941 (1962); C. G. Honegger, Helv. 45, 1409 (1962).

[53] E. Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer-Verlag, Berlin, 1967.

[54] L. F. Fieser und M. Fieser, "Steroide", Verlag Chemie, Weinheim, 1961.

[55] C. H. Issidorides, J. Katagawa,E. Mosettig, J. Org. Chem. 27, 4693 (1962).

E. CURRICULUM VITAE

Am 6. November 1943 wurde ich, Georg Bolliger, in Menziken (Kanton Aargau) als Sohn des Oskar Bolliger, SBB-Angestellter, und seiner Frau Eva Bolliger, geb. Kyburz, geboren. Im Jahre 1950 zogen wir nach Basel, wo ich von 1950 - 1954 die Primarschule und von 1954 - 1962 das Realgymnasium besuchte.

Im Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, um Chemie zu studieren. Das 1. Vordiplomexamen bestand ich im Frühling 1964 und die 2. Vordiplomprüfung, mit Pharmakologie als Wahlfach, legte ich im Frühling 1966 ab. Das Diplom für Chemie erwarb ich im Frühling 1967, worauf ich im September desselben Jahres unter der Leitung von Herrn Prof. Ch. Tamm mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation begann.

Während der Semesterferien arbeitete ich zweimal als Volontär in der Pharma-Entwicklungsabteilung der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

Der Schweiz. Gesellschaft für Chemische Industrie danke ich für die Gewährung eines Doktoranden-Stipendiums.

Die Ausbildung während meines Studiums an der Universität verdanke ich folgenden Herren Professoren und Dozenten:

H. Balli, F. Baumgartner, M. Brenner, K. Bucher, P. Buchner, H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, F. Gerson, C. Grob, E. Heilbronner, P. Hemmerich, P. Huber, A. Marxer, E. Miescher, M. Monnier, B. Prijs, T. Reichstein, P. Schiess, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wizinger.